



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Mário Sérgio Ribeiro dos Santos

**Estudo da mutação c.1080+1G>T do gene *P3H1* em pacientes com
Osteogênese Imperfeita atendidos no estado do Espírito Santo,
Brasil**

VITÓRIA, ES

2019

Mário Sérgio Ribeiro dos Santos

**Estudo da mutação c.1080+1G>T do gene *P3H1* em pacientes com
Osteogênese Imperfeita atendidos no estado do Espírito Santo,
Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flavia de Paula

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Sandra Ventourin von Zeidler

VITÓRIA, ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S237e Santos, Mário Sérgio Ribeiro dos, 1983-
Estudo da mutação c.1080+1G>T do gene P3H1 em
pacientes com Osteogênese Imperfeita do estado do Espírito
Santo, Brasil / Mário Sérgio Ribeiro dos Santos. - 2019.
64 f. : il.

Orientadora: Flavia de Paula.
Coorientadora: Sandra Ventrone von Zeidler.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Gene P3H1. 2. Mutação c.1080+1G>T. 3. Osteogênese
Imperfeita. I. Paula, Flavia de. II. von Zeidler, Sandra Ventrone.
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Mário Sérgio Ribeiro dos Santos

**Estudo da mutação c.1080+1G>T do gene *P3H1* em pacientes com
Osteogênese Imperfeita atendidos no estado do Espírito Santo,
Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada dia 26 de fevereiro de 2019

Prof^a. Dr^a. Flavia de Paula

**Instituição Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora**

Prof^a. Dr^a. Sandra Ventorim von Zeidler

**Instituição Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora**

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

**Instituição Universidade Federal do Espírito Santo
(membro interno)**

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci

**Instituição Universidade Federal do Espírito Santo
(membro externo)**

Prof^a. Dr^a. Flavia Imbroisi Valle Errera

**Instituição Universidade Federal do Espírito Santo
(membro suplente em exercício)**

VITÓRIA, ES

2019

DEDICATÓRIA

Dedico a todos os talentosos cientistas brasileiros e ibero-americanos, heróis sem glórias, gênios de países de criatividade ímpar.

Dedico também a todos os gênios desperdiçados escondidos em uma favela, em um morro, em uma cidade menos afortunada. Reflitamos sobre a importância de levar a educação à sério, por tantas pessoas anônimas que poderiam colaborar para o bem comum da sociedade e para a valorização e reconhecimento do Brasil no mundo inteiro.

AGRADECIMENTOS

A realização da presente dissertação de mestrado não poderia ter sido possível sem o precioso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar agradeço às professoras Sandra Ventorim von Zeidler e Flavia de Paula. À professora Sandra por me acolher e abrir várias portas para mim, por suas palavras de incentivo e seus ensinamentos acadêmicos. À professora Flavia por aceitar ser minha orientadora, por seu empenho, disponibilidade, compreensão e competência.

Agradeço à toda equipe e estudantes do NGHM, em especial a bióloga Rhana Evangelista Salazar e a mestre Maira Trancozo, cuja colaboração foi essencial durante o mestrado.

Agradeço à UFES, à FACITEC, MCTI/CNPQ/MEC/CAPES e a CNPq/MS-Decit/SESA/FAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço à minha mãe Rozali e aos meus irmãos Eduardo e Luís pelo seu apoio, confiança e motivação incondicionais, e aos meus amigos, em especial Marcio, Raisa e Pravila. Neste mundo repleto de pessoas ruins, vocês me fazem crer que as pessoas boas possam ser a maioria.

Tenho que agradecer a todas estas pessoas que passaram por mim nestes dois últimos anos na certeza de que deixaram um pouco de cada uma delas comigo.

Recentemente fui diagnosticado com a Síndrome de Asperger, uma forma de autismo de alto processamento que afeta a capacidade de comunicação e socialização com eficiência.

Diferentemente do autismo “clássico”, o portador da Síndrome de Asperger apresenta não somente a maioria das suas funções neurocognitivas preservadas, como também apresenta algumas destas em níveis acima da média. Eu ouço todos os sons ao mesmo tempo, ficando completamente sobrecarregado, não compreendo a linguagem

não-verbal e olhar nos olhos de uma outra pessoa pode ser uma experiência quase dolorosa.

Durante grande parte da minha caminhada enfrentei inúmeros desafios, sendo muitas vezes perseguido. Ser um autista nesta sociedade pode ser bastante penoso, principalmente pela comunicação dar-se muito nas entrelinhas. É como estar preso sozinho em um mundo que não o compreende e que você não pode compreender.

Minha vida poderia ter sido completamente diferente caso eu fosse diagnosticado como um autista quando criança, e não quando um homem adulto. O Asperger infelizmente ainda é pouco conhecido, embora seja mais comum do que pareça.

Era terrível me sentir “diferente” e não entender o porquê, mas agora com o entendimento de que a forma como recebo e processo a informação é diferente do padrão, posso me aceitar como um neuroatípico.

Quando digo às pessoas que sou autista, é comum escutar: “Mas você não age como um autista”. Quero então dizer: “E como eu deveria agir?” Você não pode dizer que uma pessoa está no espectro só de olhar para ela. Nenhum autista é igual.

Agora eu não me sinto mais estranho e desajustado frente a sociedade. Sinto como se a minha vida tivesse sido de um certo modo validada. Por mais estranho que possa parecer.

Então agradeço à psicóloga Luciana Britto por me acompanhar durante este último ano de mestrado e abrir meus olhos para uma melhor compreensão acerca de mim mesmo, sobre aprendizagem e os desafios emocionais e comportamentais que outrora pareciam inexplicáveis para mim.

Se aqui estou, deve haver um motivo especial. Pude me tornar um exemplo. Apesar de todas as minhas limitações cognitivas para a comunicação e a socialização, graças ao apoio de todas estas pessoas amigas, eu fui capaz de vencer. Se eu fui capaz, tenho certeza que com apoio qualquer um também é. E isso é um ótimo sentimento.

“Sou diferente, sou como você”.

EPÍGRAFE

“O que é ideal? É aquele pensamento, aquele sentimento intenso, constante e persistente, para onde convergem todas as nossas faculdades e atividades, e que com o volver dos tempos acabará por contribuir para a nossa felicidade ou desenvoltura”. (Padre Roberto Landell de Moura)

RESUMO

SANTOS, M.S.R. **Estudo da mutação c.1080+1G>T do gene *P3H1* em pacientes com Osteogênese Imperfeita atendidos no estado do Espírito Santo, Brasil.** 2019. 64f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma doença óssea hereditária rara caracterizada por ossos frágeis e quebradiços que resultam em fraturas em crianças e adultos. É uma desordem relacionada ao colágeno, o principal componente da matriz extracelular dos tecidos conjuntivos. Nos últimos anos, muitos genes têm sido identificados com diferentes padrões de herança relacionados a OI. Estas anomalias são comumente relacionadas às mutações nos genes codificadores do colágeno tipo I, responsáveis pelo aparecimento das formas autossômicas dominantes da doença. Dentre aqueles herdados de forma autossômica recessiva destaca-se o gene *P3H1*, o codificador de um dos três componentes proteicos formadores do complexo de 3-hidroxilação da prolina do colágeno tipo I. Este trabalho teve como objetivo estudar a mutação c.1080+1G>T do gene *P3H1* em pacientes com diagnóstico clínico de OI do estado do Espírito Santo (ES), Brasil. Foram analisados por Sequenciamento de Sanger 10 pacientes atendidos em hospitais de referência no tratamento de OI no estado do ES. Não foi identificada a mutação c.1080+1G>T do gene *P3H1* em nenhum paciente estudado nesta pesquisa. Apesar do pequeno número amostral desta pesquisa, os resultados deste trabalho sugerem que esta mutação é rara em pacientes com OI do ES. Caracterizar a distribuição de mutações em genes relacionados a OI amplia nosso conhecimento acerca da variabilidade genética e fenotípica presente na doença em diferentes populações e auxilia no planejamento de novas estratégias para diagnósticos moleculares da OI.

Palavras-chave: Gene *P3H1*. Mutação c.1080+1G>T. Osteogênese Imperfeita.

ABSTRACT

SANTOS, M.S.R. **Study of the c.1080+1G>T mutation of the *P3H1* gene in patients with Osteogenesis Imperfecta of the Espírito Santo state, Brazil.** 2019. 64f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Osteogenesis imperfecta (OI) is a rare inherited bone disease characterized by fragile and brittle bones that results in fractures in children and adults. It is a disorder related to collagen, the main component of the extracellular matrix of connective tissues. In recent years, many genes have been identified with different inheritance patterns related to OI. These anomalies are commonly related to the mutations in genes encoding type I collagen, responsible for the appearance of the dominant autosomal forms of the disease. Among those inherited in an autosomal recessive form stands out the *P3H1* gene, the encoder of one of the three protein components forming the 3-hydroxylation complex of proline of collagen type I. This work aimed to study the c.1080+1G>T mutation of the gene *P3H1* in patients with clinical diagnosis of OI in the state of Espírito Santo (ES), Brazil. Sanger Sequencing was performed in 10 patients attended at reference hospitals in the treatment of OI in the ES state. The c.1080+1G>T mutation of the gene *P3H1* was not identified in any patient studied in this study. Despite the small sample size of this research, the results of this work suggest that this mutation is rare in patients with ES. Characterizing the distribution of mutations in genes related to OI increases our knowledge about the genetic and phenotypic variability present in the disease in different populations and helps in the planning of new strategies for molecular diagnoses of OI.

Key words: *P3H1* gene. c.1080+1G>T mutation. Osteogenesis Imperfecta.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Restos mortais de uma criança com OI	20
Figura 2: Mesma criança da Figura 1. Observamos à esquerda dentes com dentinogênese imperfeita e, à direita, ossos finos e pouco desenvolvidos	21
Figura 3: A Heterogenidade clínica da OI.....	24
Figura 4: Relação entre as formas Dominante e Recessiva de OI.....	28
Figura 5: Estrutura do Colágeno.....	29
Figura 6: Biossíntese do colágeno tipo I com as enzimas e organelas envolvidas.....	30
Figura 7: Representação esquemática do 3-hidroxilação da prolina do colágeno.....	32
Figura 8: Genes envolvidos na modificação pós-traducional do colágeno tipo I.....	34
Figura 9: Heredogramas de todos os pacientes componentes das amostras.....	42
Figura 10: Eletroferograma ilustrando o ponto da mutação c.1080+1G>T no gene <i>P3H1</i>	49
Figura 11: Eletroferogramas ilustrando o resultado normal da análise de 10 pacientes com diagnóstico clínico de OI na investigação da mutação c.1080+1G>T no gene <i>P3H1</i>	50
Figura 12: A população escrava na região Sudeste do Brasil.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Primers utilizados para a amplificação do exon 5 do gene <i>P3H1</i>	45
Quadro 2: Padronização referente às etapas de amplificação do DNA.....	45
Quadro 3: Reagentes presentes na reação de amplificação do DNA.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de SILLENCE et al. (1979).....	23
Tabela 2. Classificação da Osteogênese Imperfeita referente ao gene mutado.....	26
Tabela 3: Caracterização da amostra.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAV9 – vírus adeno-associado 9

ADAMT2 – trombospondina 2

AD – autossômico (a) dominante

AME – Atrofia muscular espinhal

AR – autossômico (a) recessivo (a)

BMP1 – proteína morfogenética óssea 1

COL1A1 – gene do colágeno tipo I, alfa 1

COL1A2 – gene do colágeno tipo I, alfa 2

CRATP – proteína formadora da cartilagem

CTP – códon de terminação prematura

CypB – ciclofilina B

DNA – Desoxyribonucleic acid ou ácido desoxirribonucleico

DMO – densitometria mineral óssea

DXA - absorciometria por dupla emissão de raios-x

EF – Elementos finitos

ES – Espírito Santo

FDA – Food and Drug Administration

FK506 – proteína que atua sobre a prolil isomerase e relacionada a função das ciclofilinas

FKBP10 – gene codificador da proteína FK506

Gli – glicina

IFITM5 – gene da BRIL Bone-restricted ifitim-like protein

KDEL – sequência-sinal de aminoácidos Lys-Asp-Glu-Leu (Lisina, Aspartato, Glutamato, Leucina) que regula a secreção de uma proteína no RE.

MEC – matriz extracelular

Min – minutos

mL – mililitros

mM – milimolar

NCBI – National Center for Biotechnology Information ou Centro Nacional de Informação Biotecnológica

OI – Osteogênese Imperfeita

P3H1 – gene codificador da proteína prolil 3-hidroxilase 1

P3H1 – proteína prolil 3-hidroxilase 1

P3H2 – proteína prolil 3-hidroxilase 2

P4H1 – proteína prolil 4-hidroxilase 1

PCR – reação em cadeia da polimerase

PPIB – gene codificador da proteína CypB

Pro707 – prolina posição 707

Pro986 – prolina posição 986

PTH1-34 – Teriparatida

RE – retículo endoplasmático

RER – retículo endoplasmático rugoso

RPKM – Reads Per Kilobase per Million mapped reads ou Reads Por Kilobase por Milhão de reads mapeados

Rpm – rotações por minuto

Seg - segundos

SERPINH1 – proteína humana chaperona do colágeno

SNM – proteína de sobrevivência do neurônio motor

SNM1 – gene codificador da proteína SNM

TGF β – antagonismo do fator do transformante crescimento beta

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

μ L – microlito

°C – grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 HISTÓRICO DA DOENÇA	20
2.1.1 OSTEOGÊNESE IMPERFEITA (OI)	22
2.1.2 CAUSAS E CLASSIFICAÇÃO	23
2.2 COLÁGENO	29
2.3 GENE <i>P3H1</i> E SUA FUNÇÃO NO PROCESSAMENTO DO COLÁGENO	31
2.3.1 MUTAÇÕES DO GENE <i>P3H1</i>	33
2.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA DOENÇA	35
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 CASUÍSTICA	40
4.2 MÉTODOS	43
4.2.1 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E DE MATERIAL BIOLÓGICO	43
4.2.2 AMPLIFICAÇÃO DO EXON 5 DO GENE <i>P3H1</i>	44
4.2.3 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE	46
5 RESULTADOS	50
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A Osteogênese imperfeita (OI), doença de Lobstein ou doença de Ekman-Lobstein, é uma enfermidade rara que ocorre em cerca de 1 a cada 10.000 a 20.000 nascidos vivos (FOLKESTAD et al., 2017; FORLINO; MARINI, 2016; LIM et al., 2017; MONTI et al., 2010).

Trata-se de um grupo fenotipicamente e geneticamente heterogêneo de displasias hereditárias diretamente relacionadas às desordens do tecido conjuntivo, ou seja, uma desordem genética derivada de um distúrbio da matriz extracelular (MEC), cuja principal manifestação clínica é a fragilidade esquelética com consequente suscetibilidade a fraturas (MARINI et al., 2007a).

Em média, 77% dos casos de OI têm a sua causa ligada às mutações heterozigóticas encontradas em *COL1A1* e *COL1A2*, os genes que codificam as duas cadeias alfa-1 ($\alpha 1$) e a cadeia alfa-2 ($\alpha 2$) do colágeno tipo I, o principal componente da MEC presente nos ossos (BARDAL et al., 2016). Estas mutações são responsáveis pelo aparecimento de defeitos quantitativos ou qualitativos na produção do colágeno tipo I (FORLINO et al., 2011; KÖRKKÖ et al., 1998; WILLING et al., 1996).

Ainda que historicamente a OI tenha sido classificada como uma anomalia autossômica dominante (AD) do colágeno tipo I, os mais recentes estudos foram responsáveis pela descoberta e identificação de diversos genes responsáveis pela OI herdada com um traço autossômico recessivo (AR) (CABRAL et al., 2007; MORELLO et al., 2006; VAN DIJK et al., 2009).

Casos de OI com padrão de herança AR, causados por mutações em outros genes, estão relacionados, em geral, com alterações em processos de transcrição, transporte ou modificações pós-traducionais do colágeno tipo I (BYERS; PYOTT, 2012; FORLINO et al., 2011; PYOTT et al., 2013; ROHRBACH; GIUNTA, 2012).

Um dos genes com uma das maiores taxas de mutações em OI dentre aqueles relacionados com herança AR é o gene *P3H1*, o codificador da proteína prolil 3-hidroxilase 1 (P3H1) que atua na formação de um complexo molecular com a proteína formadora de cartilagem (CRTAP) e a ciclofilina B (CypB, codificada por *PPIB*) no

retículo endoplasmático (RE) responsável pelo processo de 3-hidroxilação de resíduos específicos da prolina durante a modificação pós-traducional do colágeno (MARINI et al., 2007a, 2007b). A mutação c.1080+1G>T, a mais frequente em *P3H1*, é a causa para a aparição de uma forma de OI cuja gravidade varia de letal perinatal a severa (CABRAL et al., 2009, 2012).

Novas descobertas genéticas feitas nos últimos anos têm contribuído para uma melhor explicação da OI, levando a uma maior compreensão acerca de sua fisiologia, o que por sua vez aumenta as nossas perspectivas, proporcionando mais oportunidades para o desenvolvimento de novas terapias.

Conhecer as mutações causadoras da OI e identifica-las, entendendo cada um dos defeitos genéticos, fornecerá as bases para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de diagnóstico molecular. A identificação das mutações nos pacientes auxilia no diagnóstico da doença, contribuindo com a escolha do tratamento mais adequado, proporcionando melhor prognóstico. Além disto, a identificação de mutações permite a realização de aconselhamento genético mais fidedigno às famílias, uma vez que estas doenças são heterogêneas, podendo ser causadas por mutações em genes distintos, o que pode resultar em diferentes riscos de recorrência. Assim, este trabalho teve como enfoque analisar a distribuição da mutação mais frequente do gene *P3H1* em pacientes com OI do estado do Espírito Santo (ES), no Brasil. No futuro, esta informação poderá contribuir com o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico molecular mais eficientes para a OI na população brasileira.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO DA DOENÇA

Apesar de ser considerada uma doença genética rara que atinge cerca de meio milhão de pessoas, há relatos da sua existência há mais de três mil anos. O primeiro caso parece ter sido de um bebê do Egito e data de 1.000 antes de Cristo, conclusão obtida após estudos sobre os restos de uma múmia egípcia (LOWENSTEIN, 2009). Em estudo realizado por Garstang (1907), encontrou-se em crânio parcialmente reconstruído, deformidade “Tam O’Shanter” (Figura 1), e no mesmo estudo aliado a exames radiográficos, foi possível observar dentes com dentinogênese imperfeita e ossos finos e pouco desenvolvidos (Figura 2).

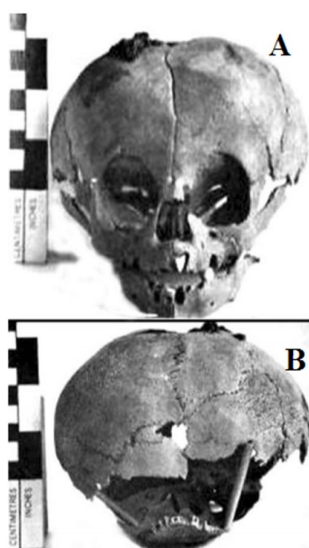


Figura 1: Restos mortais de uma criança com OI. Aspectos anterior (A) e posterior (B) do crânio parcialmente reconstruído.

Fonte: Modificado de GRAY, 1969; LOWENSTEIN, 2009.

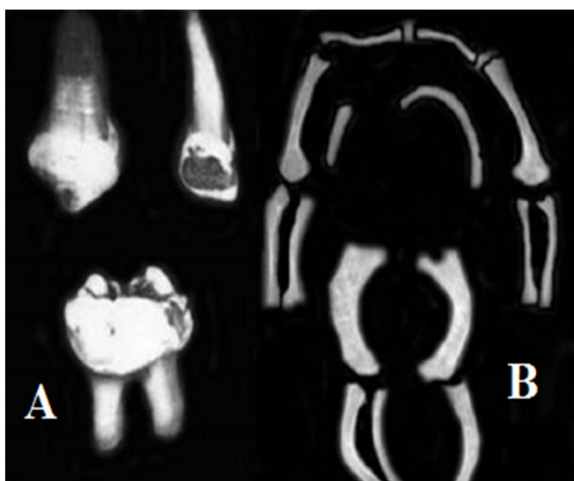


Figura 2: Mesma criança apresentada na Figura 1. Observamos à esquerda (A) dentes com dentinogênese imperfeita e, à direita (B), ossos finos e pouco desenvolvidos.

Fonte: Modificado de GRAY, 1969; LOWENSTEIN, 2009.

Os primeiros estudos sobre OI foram feitos em 1788 por Olof Jakob Ekman, em uma tese de doutorado para a universidade de Uppsala. Em 1833, o médico alemão Jean Lobstein descreveu a OI tipo I como “doença de Lobstein” (ROBICHON; GERMAIN, 1968).

Foi apenas em 1849 que o anatomista alemão Willem Vrolik identificou a doença pela primeira vez em recém-nascidos, introduzindo o termo “osteogenesis imperfecta”, e foi um dos primeiros a perceber que a OI surge de uma “energia generativa” intrínseca “insuficiente” e não como resultado de uma condição adquirida (BALJET, 2002).

Dez anos depois foi o médico inglês Edward Ormerod quem detectou a patologia em uma mulher de 68 anos com apenas um metro de altura, que transmitiu a doença aos seus descendentes (ORMEROD, 1859). Pela notoriedade do caso, o seu esqueleto encontra-se preservado no Colégio Real de Cirurgiões de Londres.

Contudo, apenas em 1979, o médico australiano David Sillence classificou a doença em quatro categorias que ao longo dos anos vêm recebendo as necessárias adaptações.

2.1.1 OSTEOGÊNESE IMPERFEITA (OI)

A OI, a “doença dos ossos quebradiços”, apresenta um quadro clínico composto por fraturas nos ossos longos e compressões vertebrais, além de deformidades variáveis dos ossos longos, costelas e coluna vertebral, e deficiência substancial do crescimento (MARINI, 2011; MARINI et al., 2007a; PALOMO et al., 2015; SILLENCE; SENN; DANKS, 1979).

O fenótipo do doente é variável, podendo apresentar uma ou mais características da osteoporose em idade adulta ou levando a letalidade em crianças causada por complicações cardiorrespiratórias (LINDAHL et al., 2014). Mesmo adultos que apresentam uma forma mais “leve” de OI podem exibir significativos sintomas musculoesqueléticos, como artrite, dores nas costas, fraturas, escoliose e ruptura de tendões. As deformidades esqueléticas são também frequentemente acompanhadas por deformidades dos membros e da caixa torácica (*pectus carinatum*) e frouxidão articular (ARPONEN; MÄKITIE; WALTIMO-SIRÉN, 2014; MARINI et al., 2007a; MCKIERNAN, 2005).

Embora envolva primariamente o tecido ósseo, a OI é uma desordem generalizada de todo o tecido conjuntivo. As demais manifestações sistêmicas podem incluir a perda da audição (devido a uma otoesclerose), anormalidades nos dentes conhecidas como dentinogênese imperfeita, displasia dentinária (dentes fracos e descoloridos), além de má oclusão dental, descoloração da esclera (dando-lhe um aspecto azul-acinzentado), hipercalciúria, hiperlaxia articular, dilatação da aorta e condições neurológicas como macrocefalia e invaginação basilar (ARPONEN; MÄKITIE; WALTIMO-SIRÉN, 2014; BIGGIN; MUNNS, 2014; LAMANNA et al., 2013; LINDAHL et al., 2014; MONTI et al., 2010; TREJO; RAUCH, 2016). Outros achados oculares associados a OI podem incluir a baixa rigidez ocular e córneas finas (KAISER-KUPFER et al., 1981). Podem ainda ser observados o comprometimento da função pulmonar, anormalidades da valva cardíaca, fraqueza muscular e laxidade ligamentar (MARINI, 2011; MARINI et al., 2017).

Existe uma grande variabilidade na presença e na gravidade das características herdadas pelos pacientes. Alguns pacientes apresentam deformidade esquelética

considerável com esclera normal, outros apresentam deformidade com esclera descolorada, enquanto uma pequena proporção dos casos morre no período neonatal.

2.1.2 CAUSAS E CLASSIFICAÇÃO

Sillence et al. (1979) propuseram um sistema de classificação para a OI em quatro tipos de gravidade baseados em achados clínicos e radiológicos (Tabela 1 e Figura 3): tipo I (leve não deformante), tipo II (perinatal letal), tipo III (gravemente deformante) e tipo IV (moderadamente deformante).

Tabela 1: Classificação de SILLENCE et al. (1979).

Classificação	Níveis de gravidade	Características clínicas observadas
Tipo I	Leve	Caracterizada por esclera azul-acinzentada, estatura quase normal e perda auditiva de início tardio, sem dentinogênese imperfeita aparente.
Tipo II	Letal pré e pós-nascimento	Forma perinatal e letal.
Tipo III	Grave	Variedade de deformação progressiva.
Tipo IV	Moderada	Caracterizada por esclera branca, baixa estatura, deformidade óssea e dentinogênese imperfeita, é mais grave que o Tipo I e menos severa que os Tipos II e III.

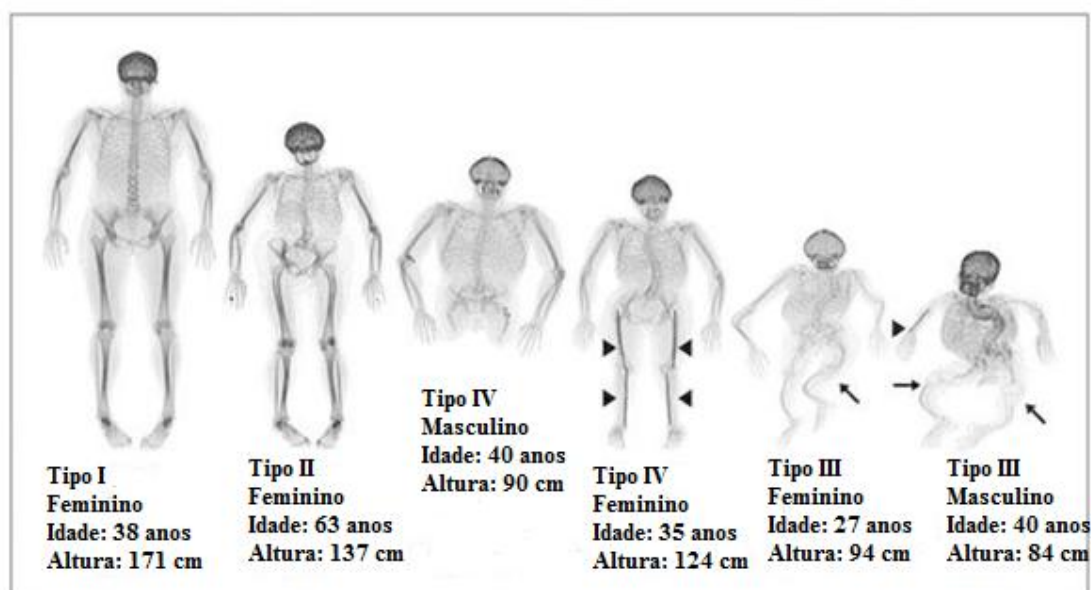


Figura 3: Heterogenidade clínica da OI. Exame de absorciometria por dupla emissão de raios-x (DXA) de corpo inteiro.

Fonte: Modificado de REEDER; ORWOLL, 2006.

A classificação de Sillence et al. (1979) é amplamente utilizada na prática clínica, principalmente nos casos em que os aspectos genéticos ainda não foram investigados, quando os pacientes ainda não possuem diagnóstico molecular conclusivo. A identificação das mutações nos pacientes por meio de métodos de diagnóstico molecular, fornece uma eficiente base para o aconselhamento genético, contribuindo com a prevenção de novos casos da doença na população.

Enquanto a maioria dos casos de OI têm herança AD ligada às mutações nos genes codificadores do colágeno tipo I (*COL1A1* e *COL1A2*), mutações estas que alteram a estrutura e quantidade da referente proteína resultando em um fenótipo esquelético que varia do subclínico ao letal (BARSH; BYERS, 1981; GAJKO-GALICKA, 2002; MARINI et al., 2007a), a partir de 2006 foram descobertas a existência de novas mutações em genes relacionados ao colágeno, apresentando ainda diferentes

padrões de herança e sendo responsáveis pelo aparecimento de diversas formas de OI (KANG; MARINI, 2017).

À medida que novos genes causadores são descobertos, a classificação proposta vem sendo ampliada, e alternativamente foi proposta a atual classificação genética criada através de modificações de referências (Tabela 2) (FORLINO et al., 2011; MARINI; REICH; SMITH, 2014; VALADARES et al., 2014).

Uma nova mutação no gene *IFITM5*, que codifica uma proteína transmembrana osteoblástica específica que pode estar relacionada à mineralização óssea, foi descrita em 2012 e está relacionada ao aparecimento da OI tipo V, uma forma predominantemente herdada da OI (CHO et al., 2012; MOFFATT et al., 2008; SEMLER et al., 2012).

A maioria dos novos genes descobertos ligados ao aparecimento da OI codificam proteínas associadas às vias cruciais para os processos de desenvolvimento ósseo ainda não conhecidas. É importante observar que a própria via da 3-hidroxilação está conectada entre a mineralização óssea e o desenvolvimento vascular e a proteólise intramembranosa regulada, tendo esta sido estudada extensivamente devido ao seu efeito no metabolismo do colesterol, processo que também afeta os ossos (FORLINO; MARINI, 2016).

A descoberta destes novos genes causadores foi o determinante para a adaptação do sistema de classificação da OI. A nova classificação da doença está de acordo com o fenótipo no paciente e com a localização das mutações causadoras da doença (FORLINO et al., 2011; MARINI; BLISSETT, 2013).

Tipo	Herança	Gene	Proteína	Defeito	Fenótipo
I	Autossômica Dominante	<i>COL1A1/COL1A2</i>	Colágeno α1 (I)	Quantitativo do colágeno	Leve, não-deformante
II		<i>COL1A1/COL1A2</i>	Colágeno α1 (I)/α2 (I)	Estrutural do colágeno	Letal perinatal
III		<i>COL1A1/COL1A2</i>	Colágeno α1 (I)/α2 (I)	Estrutural do colágeno	Progressivamente deformante
IV		<i>COL1A1/COL1A2</i>	Colágeno α1 (I)/α2 (I)	Estrutural do colágeno	Moderadamente deformante
V		<i>IFITM5</i>	BRIL	Mineralização da matriz	Histologia distinta, moderada
VI	Autossômica recessiva	<i>SERPINF1</i>	PEDF	Desconhecido	Histologia distinta, moderada a severa
VII		<i>CRTAP</i>	CRTAP	3-hidroxilação da prolina	Severa a letal
VIII		<i>P3H1</i>	P3H1	3-hidroxilação da prolina	Severa a letal
IX		<i>PPIB</i>	CypB	3-hidroxilação da prolina	Moderada a letal
X		<i>SERPINH1</i>	HSP47	Chaperona do colágeno	Severa

XI		<i>FKBP10</i>	FKBP65	Hidroxilação telopectídica	Progressivamente deformante (Síndrome de Bruck)
XII		<i>SP7</i>	SP7/osterix	Desenvolvimento dos osteoblastos	Moderada
XIII		<i>BMP1</i>	BMP1/mTLD	Processamento do colágeno	Severa, alta massa óssea
XIV		<i>TMEM38B</i>	TRIC-B	Defeito do canal catiônico	Moderada a severa
XV	Autossômica recessiva	<i>WNT1</i>	WNT1	Desconhecido	Variável
XV	Autossômica dominante	<i>WNT1</i>	WNT1	Desconhecido	Osteoporose de início precoce
Outros					
	Autossômica recessiva	<i>CREB3L1</i>	Oasis	Transcrição de <i>COL1A1</i>	Progressivamente deformante
	Ligada ao X	<i>PSL3</i>	Plastina	Defeito do osteócito	Suave
	Autossômica recessiva	<i>PLOD2</i>	Lisil- hidroxilase 2	Hidroxilação do telopectídeo do colágeno	Progressivamente deformante

Tabela 2: Classificação da Osteogênese Imperfeita referente ao gene mutado.

Fonte: Modificado de SHAKER et al. (2015).

A maioria das mutações que causam OI ocorrem no gene *COL1A1*, reduzindo a quantidade de colágeno tipo I produzido no organismo. As mutações associadas aos casos de OI tipos I, II, III e IV (as formas clássicas de OI na Tabela 1) ocorrem tanto no gene *COL1A1* quanto no gene *COL1A2*, normalmente alterando a estrutura das moléculas de colágeno tipo I (BYERS, 2000). Os fatores que mais contribuem para o seu desenvolvimento incluem o stress extracelular, rupturas das interações entre as proteínas colágenas e não-colágenas, comprometimento da MEC, anormalidades nas interações célula-célula, célula-matriz e mineralização dos tecidos (Figura 4).

As formas de OI que possuem padrão de herança recessivo, possuem fenótipos que podem variar desde gravidade moderada a forma letal perinatal. Estes casos ocorrem, em geral, devido a mutações em genes cujos produtos interagem com as fibras de colágeno tipo I. A maioria destes casos têm relação com as mutações nulas que resultam na ausência de proteínas envolvidas no processo de modificação pós-traducional do colágeno, a 3-hidroilação dos resíduos de prolina (CRATP, P3H1 e PPIB) (BALDRIDGE et al., 2008; BARNES et al., 2006, 2010; CABRAL et al., 2007; MORELLO et al., 2006; VAN DIJK et al., 2009), ou na dobra helicoidal da molécula do colágeno (FKBP10 e SERPINH1) (ALANAY et al., 2010; CHRISTIANSEN et al., 2010).

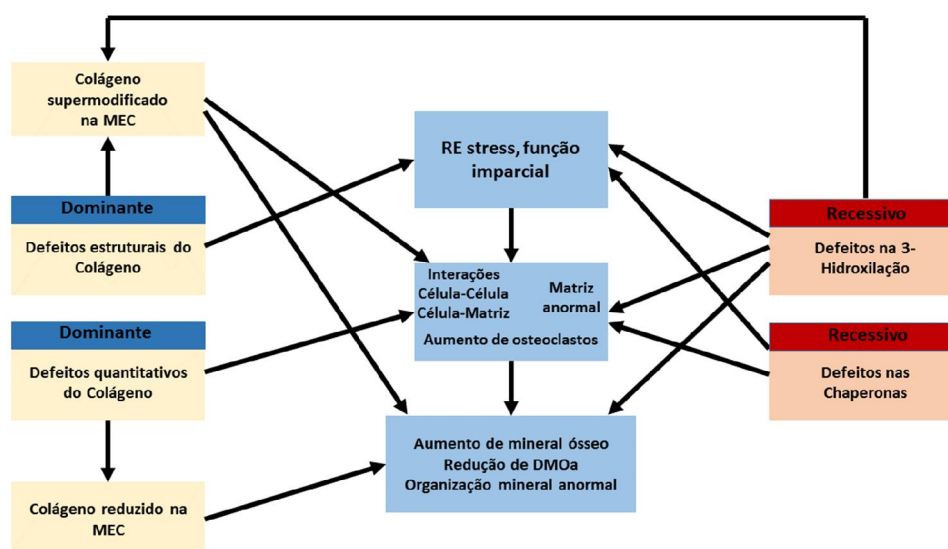


Figura 4: Relação entre as formas Dominante e Recessiva de OI. A coluna central lista mecanismos que podem ser compartilhados por ambas as mutações. Fonte: Modificado de FORLINO et al. (2011).

2.2 COLÁGENO

Correspondendo a cerca de $\frac{1}{4}$ do peso total das proteínas celulares, o colágeno forma a maior parte do conteúdo proteico do organismo dos mamíferos. Da mesma forma que as α -queratinas, o colágeno evoluiu no sentido de fornecer resistência mecânica, sendo encontrado principalmente em tecidos conjuntivos como a pele, tendões, cartilagens, na matriz orgânica de ossos, e outros conectivos que fornecem estrutura e força ao corpo e na córnea dos olhos (MAASALU et al., 2015; NELSON; COX, 2014).

Este grupo proteico é classificado de acordo com suas características estruturais e funcionais. O colágeno tipo I, secretado por osteoblastos, fibroblastos e tenócitos (BARSH; BYERS, 1981; GAJKO-GALICKA, 2002; MARINI et al., 2007a), é um heterodímero composto por duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ de poliprolina tipo II, torcidas na forma de uma tripla hélice apresentando a cada três resíduos uma glicina (Gli) compactada no centro da estrutura helicoidal tripla. A sequência de cada colágeno é caracterizada por estas repetições Gli-X-Y onde X e Y podem ser qualquer aminoácido, mas na maioria das vezes estes são a prolina e a hidroxiprolina (Figura 5).

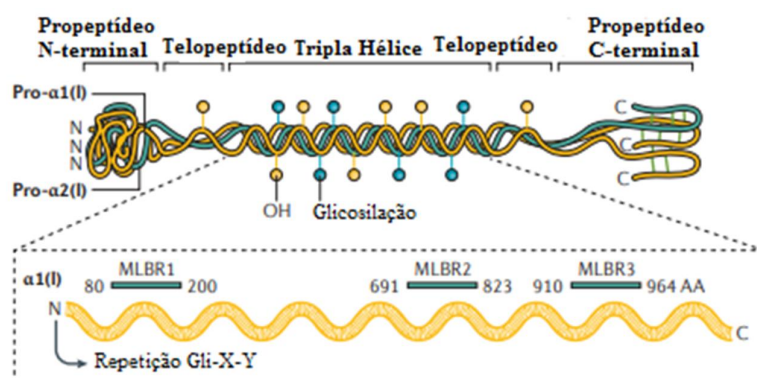


Figura 5: Estrutura do Colágeno. Fonte: Modificado de MARINI et al. (2017).

Esta unidade tripeptídica apresenta-se em cerca de 10% de toda a cadeia do colágeno e contribui conservando a estabilidade da estrutura helicoidal da molécula. As três cadeias individuais de colágeno se torcem uma em volta da outra em um arranjo super-helicoidal na forma de uma vareta rígida. Esta molécula é chamada de

tropocolágeno e suas três fitas são unidas por pontes de hidrogênio (MANDER; LIU, 2010).

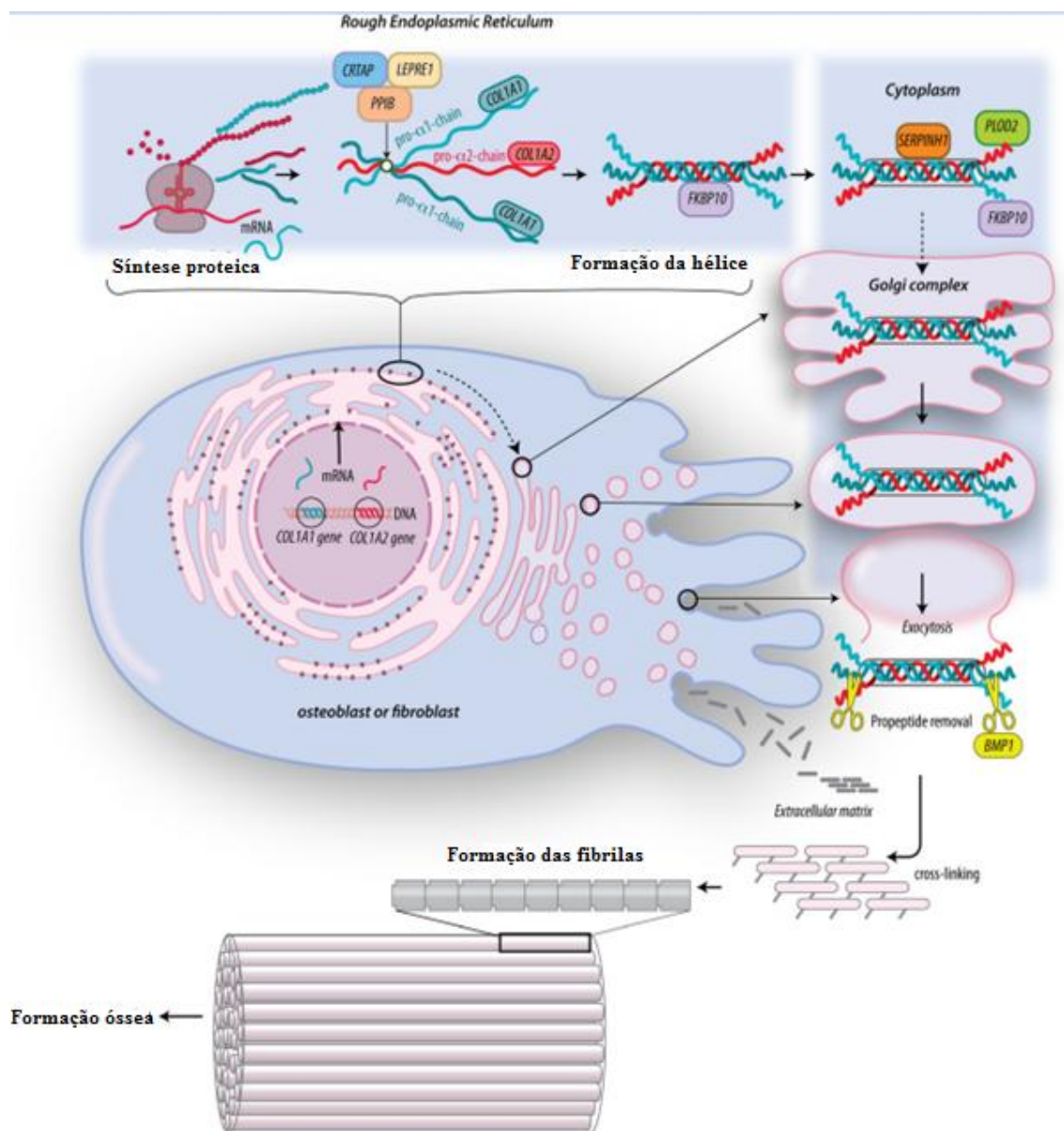


Figura 6: Biossíntese do colágeno tipo I com os genes, enzimas e organelas envolvidas: (1) tradução e modificações pós-traducionais de pro $\alpha 1$ (I) e pro $\alpha 2$ (I); (2) interações com chaperonas moleculares para prevenir a formação prematura da tripla hélice; (3) formação de hélice tripla que compreende duas cadeias pro $\alpha 1$ e uma cadeia pro $\alpha 2$; (4) secreção de procolágeno, clivagem extracelular para colágeno e reticulação.

Fonte: Modificado de VAN DIJK; SILLANCE (2014).

Apesar da estrutura relativamente simples da tripla hélice do colágeno, a biossíntese do procolágeno tipo I é extremamente complexa (Figura 6), e envolve múltiplos processos que exigem um conjunto próprio de proteínas responsáveis pelas modificações pós-traducionais, dobramento, transporte, secreção e controle de qualidade (ISHIKAWA; BÄCHINGER, 2013; MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2004).

2.3 GENE *P3H1* E SUA FUNÇÃO NO PROCESSAMENTO DO COLÁGENO

Também conhecido como *OI8*, *GROS1* e *LEPRE1*, o gene *P3H1* está localizado no cromossomo 1p34.1 (Figura 7) e apresenta cerca de 16 exons. Este gene possui expressão ubíqua na placenta (RPKM 18,9), testículos (RPKM 10,8) e em 24 outros tecidos. Foram descritas diferentes isoformas alternativamente processadas por três variantes transcritas. Outras variantes podem existir, mas a validade biológica sobre a presença destas isoformas ainda não foi verificada (NCBI, 2018).

A relação entre a proteína P3H1 codificada pelo gene e a síntese das fibras de colágeno tipo I ocorre durante o processamento das moléculas de colágeno. Os transcritos dos genes *COL1A1* e *COL1A2* no núcleo da célula são posteriormente traduzidos no retículo endoplasmático rugoso (RER). Nesta organela, as cadeias α do colágeno tipo I por estes genes codificadas sofrem uma série de modificações pós-traducionais. O colágeno tipo I é sintetizado como procolágeno, apresentando sequências de propeptídeos amino-terminais (N-terminal) e carboxi-terminais (C-terminal) que são proteoliticamente clivadas por proteases específicas, uma desintegrina e uma metaloproteinase com motivos de trombospondina 2 (ADAMTS2) e a proteína morfogenética óssea 1 (BMP1), respectivamente (COLIGE et al., 1997). As prolinas helicoidais na posição Y da repetição Gli-X-Y da molécula de procolágeno são hidroxiladas na posição C4 pela enzima prolil 4-hidroxilase 1 (P4H1) e as prolinas específicas na posição X são hidroxiladas pelas enzimas P3H1 e prolil 3-hidroxilase 2 (P3H2) (MARINI et al., 2017).

A hidroxilação dos resíduos de prolina, assim como a hidroxilação dos resíduos de lisina, prossegue para a formação da molécula de tripla hélice da extremidade C-terminal para a extremidade do N-terminal. As proteínas que formam o complexo de

3-hidroxição (P3H1/CRTAP/CypB), junto com a proteína FK506 (codificada pelo gene *FKB10*) no RE, são responsáveis pela 3-hidroxição de resíduos específicos de prolina (Figura 7) na posição 986 (pro986) das cadeias $\alpha 1$ (I) e $\alpha 1$ (II) do colágeno e na posição 707 (pro707) da cadeia $\alpha 2$ (I) do colágeno (FORLINO et al., 2011; MORELLO et al., 2006; VRANKA; SAKAI; BÄCHINGER, 2004; WEIS et al., 2010). O complexo proteico de 3-hidroxição atua principalmente sobre a pro986 de $\alpha 1$ (I) (MARINI et al., 2007b).

A 3-hidroxição parece ser crítica para o dobramento normal, montagem e secreção das moléculas do colágeno nos espaços ao redor das células (MEC) (CABRAL et al., 2007; FORLINO et al., 2011; MORELLO et al., 2006; TRYGGVASON et al., 1979; VRANKA; SAKAI; BÄCHINGER, 2004).

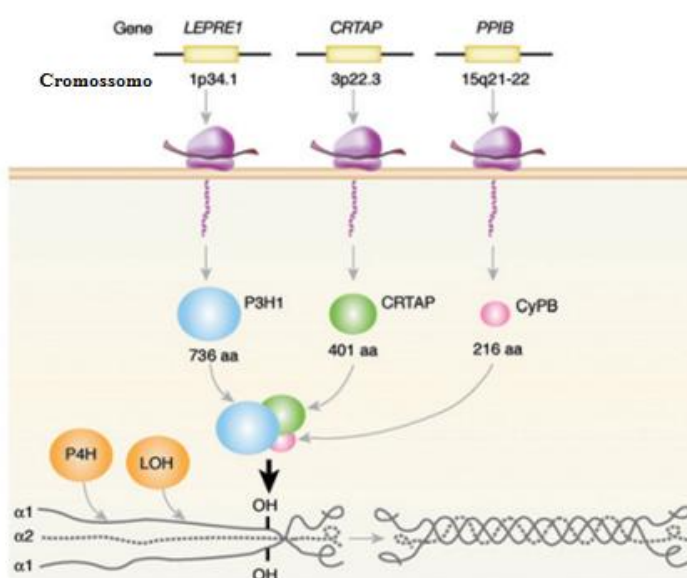


Figura 7: Representação esquemática do 3-hidroxição da prolina do colágeno.

Fonte: Modificado de MARINI et al. (2007b).

Além de sua função na síntese e montagem das fibrilas de colágeno, este complexo funciona como local de ligação para chaperonas ou pequenos proteoglicanos ricos em leucina (HUDSON et al., 2012).

O complexo de 3-hidroxição atua como PPIase, sendo CypB uma peptidil-prolil cis-trans isomerase para o colágeno tipo I e como chaperona para o enrolamento do

colágeno, impedindo que as cadeias do colágeno tipo I se tornem prematuras no RE (ISHIKAWA et al., 2009; MORELLO et al., 2006; VRANKA; SAKAI; BÄCHINGER, 2004).

Estudos sugerem que a enzima P3H1 possui funções adicionais, podendo desempenhar um papel nas interações entre certos tipos de células e a MEC que as envolve, e pode também atuar como um supressor de tumor, impedindo o crescimento e a divisão desenfreada das células (KAUL et al., 2000).

2.3.1 MUTAÇÕES DO GENE *P3H1*

As proteínas produzidas a partir da atividade dos genes responsáveis pela formação do complexo de 3-hidroxilação atuam em conjunto para o processamento do colágeno em sua forma madura, assim mutações em quaisquer destes genes interrompem o dobramento normal, montagem e a secreção das moléculas do colágeno, levando os tecidos conjuntivos ao enfraquecimento, a graves anormalidades ósseas e a problemas de crescimento (HUDSON et al., 2012). De um modo geral, as mutações que ocorrem em quaisquer destes genes caracterizam-se por afetar os processos de modificação pós-traducional do colágeno tipo I e a secreção ou mineralização óssea, resultando em formas de OI severas e letais (DALGLEISH, 1998).

As mutações em *P3H1*, descritas pela primeira vez por Cabral et al. (2007), estão associadas ao aparecimento da OI do tipo VIII (BALDRIDGE et al., 2008; MARINI et al., 2007b; WILLAERT et al., 2009).

Estudos acerca das mutações no gene *P3H1* indicam serem estas alterações responsáveis por quase metade dos casos de indivíduos com OI de herança recessiva (DALGLEISH, 1997, 1998, 2009).

De todas as mutações do gene já descritas, pelo menos quatro foram identificadas em pessoas com a forma de OI classificada como tipo VIII. Estas mutações impedem que as células produzam P3H1 funcional, e, conseqüentemente, certas formas de colágeno não são modificadas pela 3-hidroxilação da prolina (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/P3H1#conditions>) (Figura 8).

A ausência do processo de 3-hidroxilação leva à lentidão no enrolamento e ao dobramento incorreto das moléculas por um mecanismo indeterminado e à modificação pós-translacional helicoidal excessiva do colágeno tipo I (CHANG et al., 2009). Bioquimicamente, modificações em excesso na região helicoidal do colágeno envolvem o comprimento total da hélice do colágeno com efeito estrutural do colágeno na extremidade C-terminal da hélice (BARNES et al., 2006; CABRAL et al., 2007).

Além de fornecer a atividade enzimática do complexo de 3-hidroxilação, o gene *P3H1* contém a sequência de recuperação Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) ER na região C-terminal, essencial para a funcionalidade do gene. Um defeito nesta sequência é o suficiente para o início da doença (VRANKA; SAKAI; BÄCHINGER, 2004).

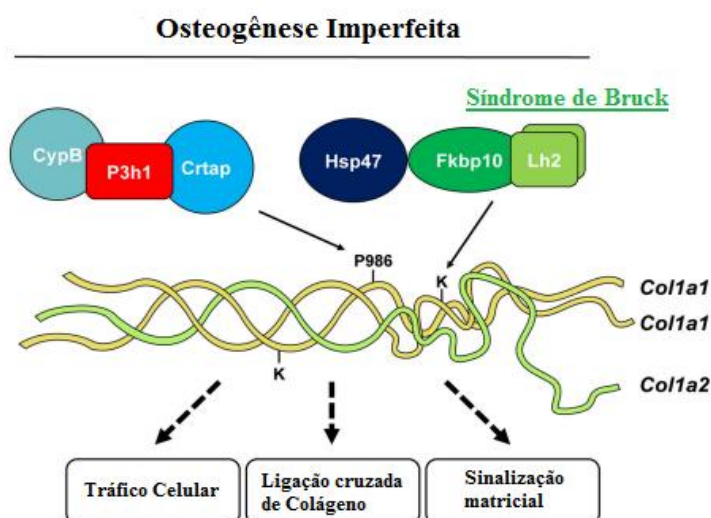


Figura 8: Genes envolvidos na modificação pós-traducional do colágeno tipo I. Os defeitos no complexo de 3-hidroxilação (CypB/P3H1/CRTAP) causam o aparecimento da OI, enquanto as mutações em Lh2/Fkbp65 relacionam-se a Síndrome de Bruck (Osteogênese Imperfeita associada a contraturas musculares).

Fonte: Modificado de LIM et al. (2017).

Fenotipicamente, os casos de OI do tipo VIII, assim como os do tipo VII, são letais ou extremamente graves. Por outro lado, alguns casos apresentam características distintas de rizomelia (desproporção do comprimento da parte proximal dos membros),

esclera branca ou azul-acinzentada e circunferência da cabeça pequena a normal em lactantes (BALDRIDGE et al., 2008; BARNES et al., 2006; CABRAL et al., 2007; WARD et al., 2002; WILLAERT et al., 2009).

De acordo com Cabral et al. (2007), esta mutação resulta em múltiplos transcritos processados alternativamente, cada um contendo um códon de terminação prematura (CTP). São conhecidas, atualmente, cerca de 17 mutações distintas, distribuídas em todo o gene *P3H1* (MARINI; CABRAL; BARNES, 2010). A mutação c.1080+1G>T está localizada no exon 5, aquele que apresenta a maior taxa de mutação segundo a literatura, no referido gene. Esta mutação apresenta frequência, aproximada, de 1/240 indivíduos na população afro-americana (CABRAL et al., 2009, 2012).

Apesar dos avanços recentes, informações sobre o perfil de mutações para a maioria dos genes associados à OI recessiva são escassas. A caracterização do padrão de mutações e a descrição de polimorfismos não patogênicos em genes relacionados à OI são cruciais para melhorar a precisão do diagnóstico molecular e do aconselhamento genético para as famílias com OI.

2.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA DOENÇA

Informações valiosas sobre o fenótipo, a gravidade clínica e mesmo o diagnóstico para a maioria dos casos de OI podem ser obtidos através de testes moleculares como a análise da estrutura e da quantidade de colágeno tipo I sintetizados *in vitro* por cultura de fibroblastos dérmicos e ainda através da análise das sequências de DNA (FORLINO; MARINI, 2016; PEPIN; BYERS, 2015; VAN DIJK et al., 2012). Estudos baseados em fibroblastos cultivados indicaram que as anormalidades no colágeno tipo I estão presentes em 98% para os pacientes com OI tipo II, em 90% dos pacientes com OI tipo I e 84% dos pacientes com OI dos tipos III e IV (STEINER; ADSIT; BASEL, 2013).

Entretanto, o diagnóstico para esta doença é geralmente dependente da apresentação clínica, isto é, essencialmente inspirado nas características clínicas apresentadas

pelos pacientes como esclera, histórico familiar, e fraturas frequentes com pouca ou nenhuma associação com a ocorrência de traumas (BARDAI et al., 2016).

Podendo ser feito ainda no período neonatal, a partir da 17ª semana de gestação, a realização de um diagnóstico pré-natal conta com dispositivos como ultrassonografias e ressonância magnética, análises de radiografias do abdômen materno e procedimentos invasivos para detecção de anormalidades sugestivas de OI como baixa mineralização do crânio, encurtamento, curvatura e fraturas dos ossos longos. A análise da síntese de procolágeno em células do líquido amniótico está entre os métodos disponíveis para estes procedimentos diagnósticos. O encaminhamento para diagnóstico molecular ocorrerá quando da presença das características clínicas sugestivas da OI (DE SOUZA et al., 2006; VAN DIJK et al., 2012).

O diagnóstico pós-natal é realizado por meio de radiografias caso haja suspeita de OI. O rastreamento da doença através de exames clínicos e radiográficos dos ossos longos e do crânio, além da avaliação da dentição, podem ser complementados com a identificação de sinais de distúrbios generalizados do tecido conjuntivo, ainda que estes sejam variáveis. Os testes genéticos serão complementares aos exames clínicos e radiológicos e confirmarão o diagnóstico de OI (VAN DIJK et al., 2012).

O diagnóstico de tipos específicos de OI pode depender da quantidade de informações clínicas disponíveis e da idade do paciente. Dependendo da idade de apresentação dos sintomas referentes a OI, pode ser difícil distingui-la de outras doenças genéticas como a síndrome de Ehlers-Danlos tipo Arthrochalasia, a dentinogênese imperfeita isolada, a esclerótica azulada e a fragilidade da córnea, a hipofosfatasia, fraturas associadas a causas não-genéticas e a osteoporose juvenil idiopática. A utilização de técnicas modernas de sequenciamento do exoma associadas a OI ou do genoma completo facilitam a obtenção de um diagnóstico molecular (BARDAI et al., 2016; DE SOUZA et al., 2006; VAN DIJK et al., 2012).

Não existe cura para a OI. Seu tratamento se baseia, principalmente, em medidas paliativas e no uso de medicamentos que reduzem a reabsorção óssea visando a redução de fraturas. O manejo dos pacientes está na dependência do tipo e da gravidade das complicações, concentrando-se em três elementos: prevenção de

fraturas, correção de deformidades ósseas e tratamento de outras complicações, como a perda auditiva, problemas dentários e respiratórios. O tratamento não-cirúrgico de fraturas em OI é geralmente o preferido, embora nem sempre apropriado. A escolha pelo tratamento cirúrgico ocorre na necessidade de tratar ou prevenir fraturas e para a correção das deformidades ósseas. Quando da escolha da cirurgia, as necessidades de procedimentos de revisão pós-operatória devem ser consideradas (ROBERTS et al., 2016).

Com os recentes avanços no entendimento da estrutura e das propriedades mecânicas dos ossos em crianças com OI, espera-se modelos melhorados de elementos finitos (EF) que possam ajudar na prevenção dos riscos de fraturas durante atividades específicas e também no planejamento da fisioterapia (SHAKER et al., 2015).

O emprego de Bisfosfonatos intravenosos têm sido extensivamente utilizados para o tratamento da OI nos casos de gravidade que variam de moderada a grave, durante a infância. Estudos mostram que, em crianças, o tratamento com Bisfosfonatos aumentou a densitometria mineral óssea (DMO) da coluna vertebral e melhorou a altura vertebral (LINDAHL et al., 2014; PALOMO et al., 2015). De acordo com revisão sistemática feita por Rijks et al. (2015), este tratamento medicamentoso reduz a dor óssea.

A terapia medicamentosa é utilizada com muito mais frequência no tratamento da OI, e, além da fisioterapia, em casos muito específicos pode haver a necessidade de recorrer a cirurgia ortopédica (PALOMO et al., 2015).

Menos conhecido é o tratamento farmacológico em adultos com OI. A terapia metabólica com Teriparatida (PTH1-34) foi estudada em adultos com a doença. E futuras terapias podem incluir anticorpos contra esclerostina, antagonismo do fator do crescimento transformante beta (TGF β), terapia gênica e terapias baseadas em células (SHAKER et al., 2015).

A reabilitação é um componente crucial no tratamento dos pacientes, e quando administrada no início do atendimento de crianças que apresentam o tipo grave da anomalia, pode facilitar o vínculo com os pais, ensinando-os a lidar com um bebê

frágil. Estas atividades reabilitadoras também visam a recuperação da função e dos procedimentos cirúrgicos, assim como a maximização da força. Sendo benéficas na infância, na primeira infância e no decorrer da infância quando existirem atrasos motores e fatores psicológicos, como o medo do movimento, impedindo o desenvolvimento das habilidades motoras, após lesão, fratura ou cirurgia (BIGGIN; MUNNS, 2014; HARRINGTON; SOCHETT; HOWARD, 2014; LAND et al., 2006; MONTI et al., 2010).

Justifica-se a utilização de ferramentas de análise molecular em doenças genéticas com a definição de estratégias para o diagnóstico precoce e preciso em pacientes afetados, proporcionando detecção de portadores, além da continuidade do tratamento e planejamento terapêutico. Contribui ainda para a previsão do prognóstico e definição de melhores estratégias para cada caso.

Estas análises moleculares específicas têm grande importância na escolha correta de tratamentos e para o aconselhamento genético familiar, podendo também fornecer aos pacientes e a seus familiares as informações sobre o curso provável do caso, permitindo ainda que os médicos avaliem os efeitos das terapias.

Descrição clínica cuidadosa em combinação com o conhecimento da causa genética molecular específica é o ponto de partida para o desenvolvimento e avaliação da terapia em pacientes com doenças hereditárias, incluindo OI.

Assim, este trabalho teve como objetivo fornecer dados moleculares referentes a frequência da mutação c.1080+1G>T do gene *P3H1* em pacientes com diagnóstico clínico de OI com o intuito de contribuir futuramente com a análise de distribuições de mutações em genes causadores de OI na população brasileira.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a frequência da mutação c.1080+1G>T do gene *P3H1* em pacientes com diagnóstico clínico de OI atendidos em hospitais de referência para o tratamento de OI do estado do ES, Brasil.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sequenciar o exon 5 do gene *P3H1* em pacientes com OI;
- Avaliar a proporção de pacientes com OI portadores da mutação c.1080+1G>T do gene *P3H1* atendidos no estado do ES.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

As amostras selecionadas para a realização deste projeto foram coletadas no Hospital Infantil Estadual Nossa Senhora da Glória, em Vitória/ES, ou no Hospital Estadual Dório Silva, em Serra/ES, conhecidos centros em referência no tratamento de pacientes com OI no Brasil.

Foram selecionados 10 pacientes, não aparentados, diagnosticados clinicamente com OI. Com exceção de um paciente com histórico de adoção o qual não foi possível definir a consanguinidade ou a presença ou ausência de mais de um membro familiar afetado, nenhum dos demais pacientes reportaram grau de consanguinidade entre seus pais, casos não consanguíneos. Cinco pacientes (5/10) citaram casos de OI em outros membros da família, casos familiares, enquanto que quatro indivíduos (4/10) eram casos isolados.

Estão presentes nas amostras cinco pacientes do sexo masculino e cinco pacientes do sexo feminino. A mediana da idade dos pacientes é de 8,5 anos (Tabela 3).

Quanto a gravidade da doença, 60% da amostra (6/10), foram diagnosticados com a forma leve da doença. 20% da amostra (2/10) apresentam um quadro clínico grave da doença. E ainda 20% da amostra (2/10) possuem um quadro clínico entre as variantes leve e moderada da doença. O paciente P.5, em específico, apresentou comprometimento visual e auditivo.

Os 10 pacientes da amostra apresentam quadro clínico compatível com OI, contudo, não há diagnóstico molecular conclusivo para nenhum deles. Amostra de DNA destes pacientes ainda não foram completamente avaliadas para nenhum dos demais genes relacionados com OI, como o *COL1A1*, *COL1A2*, ou outros genes.

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da UFES, registrado sob o número de protocolo 66020016.8.0000.5060. Todos os

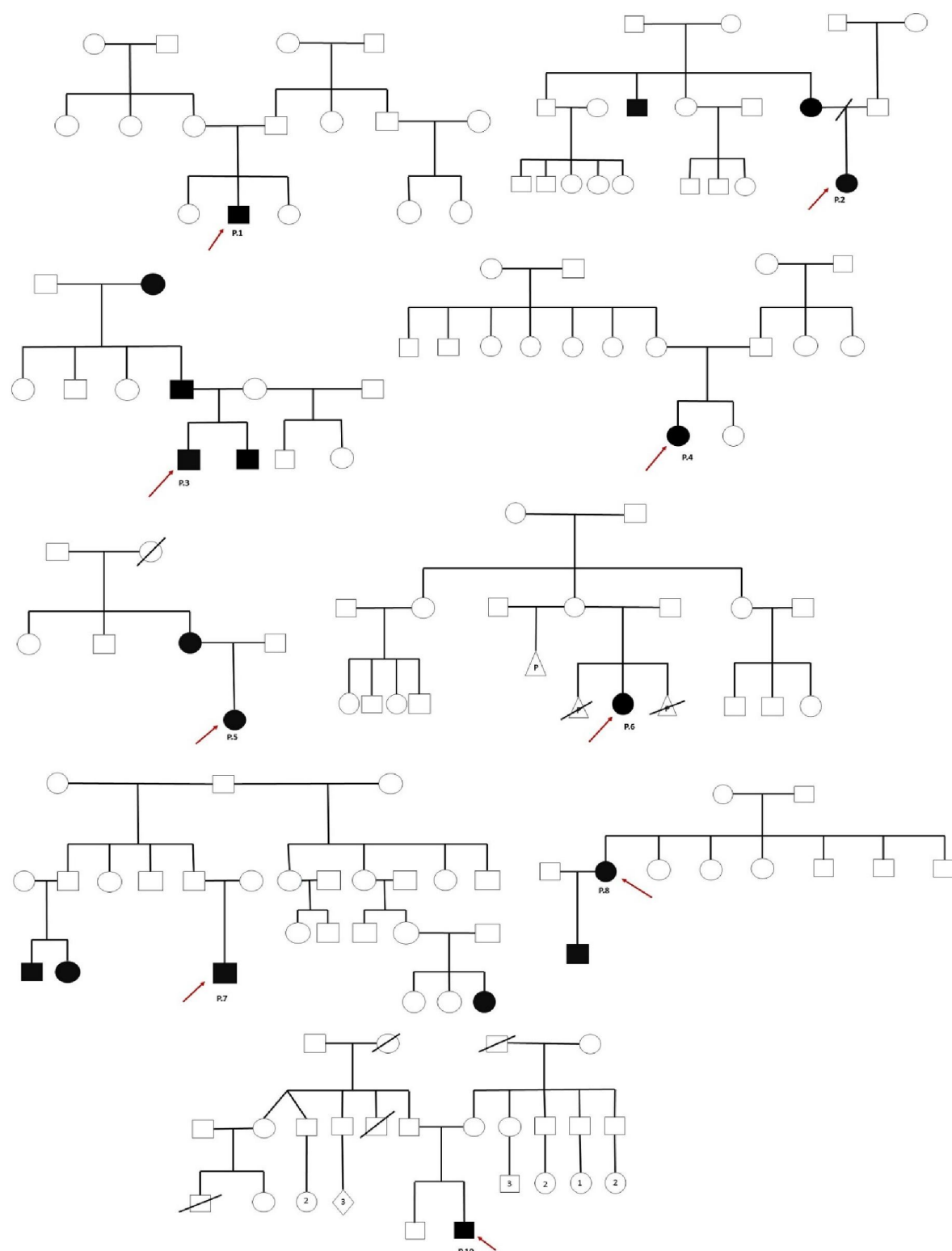
pacientes ou os seus responsáveis legais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Tabela 3: Caracterização da amostra.

P.	Sexo	Idade (anos)	Esclera azulada	Comp. Auditivo e/ou visual	D.I.	Familiar	Gravidade clínica
P.1	M	2	Sim	Não	Sim	Não	moderado
P.2	F	0,16	Sim	Não		Sim	grave
P.3	M	5	Sim	Não	Sim	Sim	leve
P.4	F	10	Sim	Não	Não	Não	leve
P.5	F	10	Sim	Sim	Sim	Sim	leve
P.6	F	7	Sim	Não	Não	Não	moderado
P.7	M	15	Sim	Não	Não	Não	leve
P.8	F	43	Sim	Sim	Sim	Sim	leve
P.9	M	21	Sim	Não	Sim	SD	leve
P.10	M	4	Não	Não	Sim	Não	grave

P.= Paciente, Comp.= comprometimento, D.I.= Dentinogênese Imperfeita, SD= sem dados.

Figura 9: Heredogramas de todos os pacientes componentes das amostras (P.1, P.2, P.3, P.4, P.5, P.6, P.7, P.8 e P.10).



4.2 MÉTODOS

A coleta das amostras biológicas deste trabalho foi realizada em colaboração com a equipe do Laboratório de Genética Humana e Molecular da UFES. As avaliações clínicas dos pacientes foram realizadas em colaboração com as equipes médicas do Hospital Infantil Estadual Nossa Senhora da Glória, em Vitória/ES, e do Hospital Estadual Dório Silva, em Serra/ES. Os procedimentos experimentais foram realizados em colaboração com Rhana Evangelista Salazar e Maira Trancozo.

4.2.1 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E DE MATERIAL BIOLÓGICO

Em função da OI ser uma doença rara, foram selecionados para este estudo os pacientes com diagnóstico clínico de OI que procuraram atendimento nos hospitais que atuam como centro de referência para o tratamento de OI no ES durante os anos de 2017 e 2018 e que ainda não tinham estudo genético prévio.

Foram coletados 5mL de sangue e as amostras foram encaminhadas ao laboratório e posteriormente foi realizada a extração do DNA de acordo com a metodologia de Miller e colaboradores (1988) com as necessárias modificações.

PROTOCOLO:

1º Dia:

O sangue periférico coletado (5 mL) é transferido para um tubo Falcon (15 mL) identificado.

Adicionada a solução lise (NH_4Cl 1550 mM; KHCO_3 100 mM; EDTA 10 mM Ph 7,4) até 13 mL. A solução é homogeneizada e colocou-se então o tubo Falcon em gelo durante pelo menos 30 min. Centrifugada a solução por 16 min a 1800 rpm, foi em seguida descartado o sobrenadante. O precipitado é lavado duas vezes em volume de 5 mL de solução de lise para a seguir ressuspender delicadamente o sobrenadante.

Após centrifugar mais duas vezes durante 6 min a 1800 rpm, é descartando novamente o sobrenadante. Após ressuspender novamente o precipitado, é adicionado 1,5 mL de Nucleolysis.

É adicionado também 35 µL de Proteinase K e 200 µL de SDS 10%, e por fim seguiu-se a etapa para homogeneizar e incubar os tubos em banho-maria overnight (37°C).

2º Dia:

Adicionou-se 0,5 mL de NaCl 6 M e agitou-se o tubo até adquirir aspecto leitoso. Calibraram-se os tubos e estes foram centrifugados durante 20 min a 2500 rpm. Transferidos foram então os sobrenadantes (DNA) para outro tubo Falcon limpo, calibrados e centrifugados a 2500 rpm durante 15 min.

Pesagem do DNA:

É adicionado o conteúdo do Falcon em cerca de 10 mL de Etanol absoluto. Coberto então com plástico, é vertido várias vezes delicadamente até que seja possível visualizar o DNA.

O DNA é coletado com capilar de vidro com a extremidade soldada. Lavado o mesmo em álcool 70% (três vezes), o DNA é colocado em outro microtubo limpo e é adicionado 200-400 µL de TE⁴ até o DNA dissolver. O capilar é descartado em seguida e o microtubo lacrado.

O microtudo é levado ao banho-maria a 65°C durante 30 min (para eliminar contaminação por DNase) e armazenado na geladeira (4°C).

4.2.2 AMPLIFICAÇÃO DO EXON 5 DO GENE *P3H1*

Os primers referentes ao exon 5 do gene *P3H1* utilizados no sequenciamento direto pela metodologia de Sanger do referido gene tiveram por referência a sequência do gene do NCBI (Quadro 1).

A amplificação do DNA extraído do material genético foi realizada através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), de acordo com as específicas padronizações para o exon (Quadros 2 e 3).

Quadro 1: *Primers* utilizados para a amplificação do exon 5 do gene *P3H1*.

EXON	EXTENSÃO DO FRAGMENTO (PB)	PRIMER	SEQUÊNCIA DO PRIMER (5' 3')
5	297	Forward	GGTCCCTGGTGCTAGGATTT
		Reverse	GCCTACTCCCCTCTGCTACC

Quadro 2: Padronização referente às etapas de amplificação do DNA.

ETAPAS DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA					
Desnaturação Inicial	Hibridização			Extensão	Ciclos
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final	
95°C/5 min	95°C/30 seg	66°C/20 seg	72°C/30 seg	72°C/7 min	26

Quadro 3: Reagentes presentes na reação de amplificação do DNA.

REAGENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR Buffer	1,0 μL	1x
MgCl₂ 50mM	0,3 μL	1,5 mM
dNTP 10mM	0,2 μL	0,2 mM
Primer Forward 10μM	0,4 μL	0,4 mM
Primer Reverse 10μM	0,4 μL	0,4 mM
Tag DNA Polimerase 5U/μL	6,6 μL	1 U
DNA 20ng/μL	0,1 μL	1,6 ng/ μL
H₂O	1,0 μL	-

4.2.3 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE

Para esta análise, foram utilizadas cerca de 5 μL das amostras devidamente amplificadas misturadas em 2 μL de corante e aplicadas em gel de poliacrilamida 6%, constituído de 7,5 mL de acrilamida, 5 mL de TBE 10x, 325 μL de APS 10%, 35 μL de TEMED e água destilada para um volume final de 50 mL. As amostras foram corridas por uma hora e 30 min a 240 Volts. Após a corrida, as amostras receberam coloração em prata.

O sequenciamento realizado após a confirmação da amplificação das referidas amostras foi administrado a partir do seguinte protocolo de acordo com o fabricante:

Foi preparado 10 μL de produto de PCR e checado em gel se a reação estava forte e limpa (OBS: Devendo sobrar 5 μL de produto para a reação de sequenciamento).

Misturado então 4 μL de produto de PCR com 1 μL de exosopro star diluída e 1 μL de fosfatase alcalina para em seguida ser levado ao termociclador na seguinte condição:

37°C por 15 min

80°C por 15 min

Após isto o produto foi guardado a 4°C até a próxima etapa.

Em outro tubo foi misturado:

4 μL da amostra com Exosap

0,32 μL de primer

1,68 μL de água	}	5,86 μL
3,5 μL de Buffer (do Big Dye)		
0,5 μL do Big Dye		

Na necessidade de mais de uma amostra é recomendado preparar mix de água/buffer/big dye em volume equivalente ao número de amostras.

No passo seguinte o produto é levado ao termociclador nas seguintes condições estabelecidas:

96°C – 1 minuto

96°C – 10 segundos	}	25X
50°C – 5 segundos		
60°C – 4 minutos		

4°C ∞

O próximo passo, a precipitação, foi realizado em centrífuga a 4°C e seguindo o protocolo para precipitação com Etanol/EDTA/Acetato de Sódio, adaptado do protocolo de Big Dye:

Ao conteúdo da reação de sequenciamento (10 µL) foi adicionado:

2 µL – Acetato de Sódio 3 M pH 5,2

2 µL – EDTA 125 mM pH 8,0

A solução foi vortexada rapidamente e, após receber a adição de 50 µL de Etanol 100%, foi novamente vortexada.

O produto é incubado à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida centrifugado por 20 min a 14000 rpm, e cuidadosamente é aspirado o sobrenadante com uma pipeta e depois descartado.

Adicionado ao pellet 250 µL de Etanol 70%, é vortexado como nos passos anteriores.

O próximo passo foi a centrifugação por 10 min a 14000 rpm, para depois, cuidadosamente, aspirar o sobrenadante com uma pipeta e descartá-lo. Estes dois últimos passos foram repetidos.

Após secar as amostras em termociclador por 3 min à 80°C, o armazenamento foi feito em geladeira e protegido da luz até o processamento.

As amostras foram, a seguir, encaminhadas ao serviço de sequenciamento do Instituto de Química da Universidade de São Paulo para finalização do sequenciamento. Os resultados gerados foram analisados com base no banco de dados de mutações: Human Collagen Mutation Database (DALGLEISH, 1997 e 1998), disponível online (<http://www.le.ac.uk/ge/collagen>). Todos os resultados obtidos foram comparados com o resultado ilustrado na figura 10 obtido a partir do trabalho de

Barbirato et al. (2015) que apresenta o ponto da mutação em um paciente portador desta mutação c.1080+1G>T em homozigose.

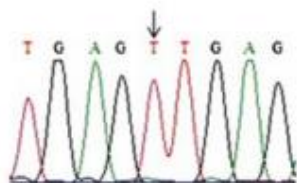


Figura 10. Eletroferograma ilustrando o ponto da mutação c.1080+1G>T no gene *P3H1*.

Fonte: Modificado de BARBIRATO et al. (2015)

5 RESULTADOS

A mutação c.1080+1G>T no gene *P3H1* foi investigada em 10 pacientes com OI que não apresentavam resultados genéticos conclusivos para genes relacionados com OI. Esta mutação não foi identificada em nenhuma das amostras estudadas. A figura 11 ilustra os resultados obtidos no presente trabalho dos pacientes analisados.

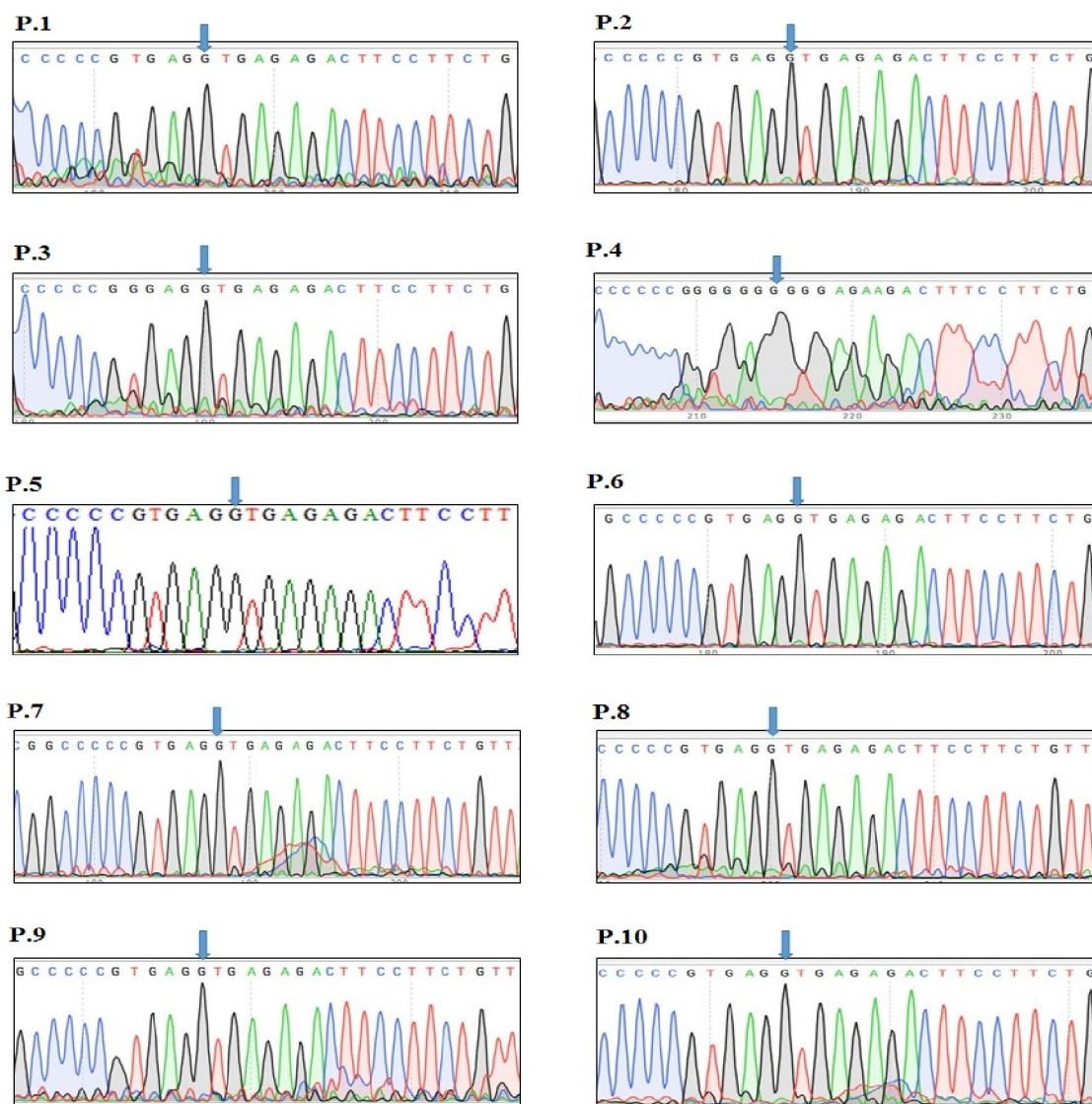


Figura 11. Eletroferogramas ilustrando o resultado normal da análise de 10 pacientes com diagnóstico clínico de OI na investigação da mutação c.1080+1G>T no gene *P3H1*. A posição da seta representa o local onde ocorre a mutação.

6 DISCUSSÃO

A mutação c.1080+1G>T do gene *P3H1* não foi encontrada em nenhum dos pacientes diagnosticados com OI que compuseram a amostra de pacientes atendidos em hospitais do estado do ES durante os anos de 2017 e 2018. Entretanto, em decorrência da reduzida quantidade amostral desta doença humana rara, não foi possível estimar a frequência desta alteração genética no grupo populacional estudado. Seria necessário ampliar o número amostral para estimar a distribuição desta mutação em pacientes com OI do ES. Contudo, como a literatura brasileira ainda é muito escassa de dados sobre a distribuição de mutações nos genes responsáveis pelo aparecimento da OI, os resultados desta pesquisa contribuirão futuramente no estabelecimento de estimativas de distribuição de mutações em pacientes com OI da população brasileira.

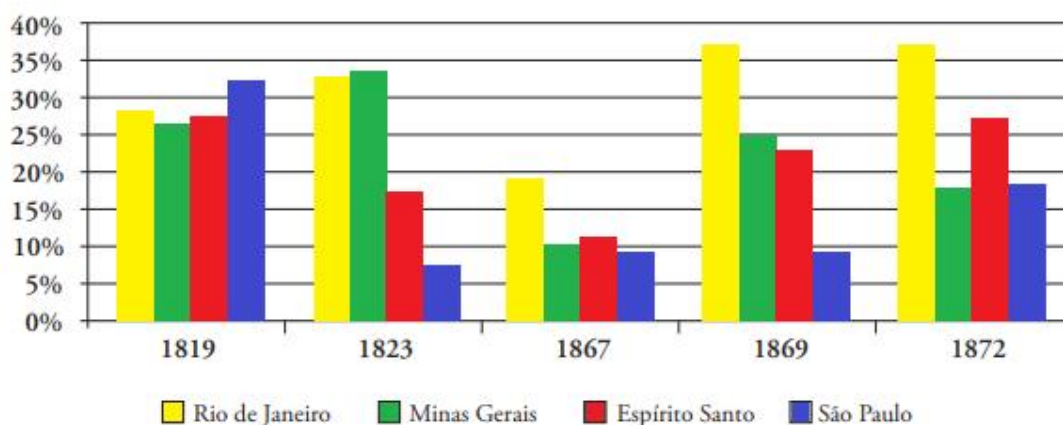
Estima-se que a mutação c.1080+1G>T possua uma prevalência de 0,4% em afro-americanos do Meio-Atlântico, correspondendo a, aproximadamente, 1/260.000 casos de nascidos com a OI que possuem padrão de herança AR. Este alelo tem origem em Gana e Nigéria na África Ocidental com uma frequência de 1%-2%, chegando a 4%-5% em indivíduos de grupos tribais. Sendo estimados que cerca de ¼ dos recém-nascidos afro-americanos portadores das formas letais perinatais são homozigotos para esta alteração de sequência única. Historicamente, acredita-se que os portadores desta mutação foram trazidos aos Estados Unidos há 650 anos durante o transporte transatlântico de escravos. Estima-se que cerca de 1,5% dos genes de ganeses e nigerianos são portadores desta mutação (CABRAL et al., 2012).

A presença de afrodescendentes no Brasil é significativa. Contudo, há poucos trabalhos que analisam as origens das migrações africanas no Brasil. Em um estudo realizado em indivíduos do estado de São Paulo, Amaral et al. (2015) estimam que 44,5% de pessoas afrodescendentes apresentam ancestralidade do Centro-Oeste da África, localidade onde situam-se os países de Gana e Nigéria, onde a mutação c.1080+1G>T do gene *P3H1* teve origem. No estudo de Amaral et al. (2015) os demais afrodescendentes (43%) tinham origem da região Oeste Africana, e o restante (12,3%) da região Sudeste Africana. Com base neste estudo, cerca de 2/5 dos afrodescendentes brasileiros poderiam ter origem dos países de Gana e Nigéria,

apoiando a hipótese de maior frequência desta mutação de origem africana em pacientes brasileiros com OI.

Historicamente, no período Brasil-Colônia, apesar da população do Espírito Santo alcançasse reduzida expansão demográfica ao longo do século XIX, a população de escravos de origem afrodescendente no total de residentes alcançava significativa expressão. Tal fato conferiria a sociedade capixaba uma marca distinta de presença afrodescendente, mesmo se comparada às economias vizinhas que hoje compõem os estados da região Sudeste do país (CAMPOS, 2011). Assim, a hipótese da mutação c.1080+1G>T ser relativamente prevalente em pacientes com OI do estado do ES é plausível e deve ser investigada em um número maior de pacientes com OI.

Figura 12: A população escrava na região Sudeste do Brasil.



Fonte: Modificado de CAMPOS (2011).

Quanto a gravidade e variabilidade clínica da OI, Cabral et al. (2007) sugerem que indivíduos portadores da mutação c.1080+1G>T em homozigose desenvolvem OI que varia de grave a letal perinatal. No presente trabalho 4/10 dos pacientes da amostra apresentavam fenótipos que variaram de moderado a grave e 6/10 de pacientes com quadro clínico leve. No presente trabalho, não houve coleta de amostras letais

intraútero ou letais perinatais, pois a coleta de amostras se concentrou em buscas ativas em hospitais, não havendo inclusão de coletas em maternidades.

A inclusão de pacientes com OI de severidade leve e mesmo de gravidade moderada foi realizada, pois, os casos de heterozigose composta envolvendo a mutação c.1080+1G>T em um alelo e outro tipo de mutação em outro alelo, poderia resultar em variações no fenótipo e na gravidade da doença. Dadas as altas taxas de miscigenação da população brasileira são esperadas consideráveis ocorrências de mutações em heterozigose composta em genes de herança autossômica recessiva. Contudo, no nosso estudo, não foram identificados pacientes portadores da mutação c.1080+1G>T nem nos casos de grave a moderado, nem nos casos de severidade leve. Além disto, esta mutação não foi identificada nem em homozigose, nem em heterozigose nos pacientes da amostra.

Na OI, assim como em várias doenças de etiologia mendelianas, dependendo da população estudada, as frequências das mutações podem mudar. Mutações diferentes podem apresentar diferentes frequências nas diversas partes do mundo. Um exemplo disso é o que acontece nas populações do Oriente Médio, especialmente as árabes, que por razões culturais, são altamente consanguíneas. As taxas de consanguinidade chegam a alcançar de 20% a 50% em todos os casamentos árabes de acordo com pesquisas baseadas nestas populações (TADMOURI et al., 2009). Na Palestina estas taxas foram estimadas em até 40% (ASSAF; KHAWAJA, 2009; SIRDAH, 2014; TADMOURI et al., 2009) e os distúrbios associados às alterações autossômicas recessivas são comuns nestas populações.

Consequentemente, as formas de herança autossômicas recessivas de OI são esperadas serem mais comuns em populações altamente consanguíneas. Por outro lado, as altas frequências de mutações autossômicas dominantes que estão ligadas aos defeitos na estrutura ou quantidade do colágeno tipo I são registradas em populações não-consanguíneas como sustentam outros estudos acerca destas observadas variações (BYERS; PYOTT, 2012; ROHRBACH; GIUNTA, 2012).

Estudos internacionais de distribuição de mutações acerca da OI, sugerem que mutações nos genes *CRTAP* e *P3H1* são responsáveis por aproximadamente 10% dos casos da doença (ÁRVAI et al., 2016). Em bancos de dados internacionais, a mutação c.1080+1G>T é a mais frequente do gene *P3H1* associado ao aparecimento da OI recessiva do tipo VIII (<http://www.le.ac.uk/ge/collagen>).

Um estudo realizado no Canadá por Bardai et al. (2016), envolvendo mais de 500 pacientes de mais de 400 famílias e residentes de variadas regiões geográficas, encontrou mutações em genes herdados recessivamente em cerca de 12% dos indivíduos com OI de moderada a grave, com as mutações no gene *P3H1* correspondendo a cerca de 1% do total de todos os casos de OI.

Embora não existam dados oficiais, estima-se no Brasil cerca de 12.000 indivíduos portadores de OI (www.aboi.org.br). A OI ganhou maior visibilidade no país quando instituído o tratamento para esta doença como uma política de saúde pública a partir de 2001 (MOREIRA et al., 2011).

Entretanto, poucos são os trabalhos investigativos da genética da OI no país, o que dificulta uma definição do padrão de mutações dos genes associados a doença e exemplifica a importância desta pesquisa para ampliar nossos conhecimentos sobre o assunto.

Os resultados obtidos a partir dos poucos estudos que avaliaram mutações no gene *P3H1* em pacientes com OI no Brasil (BARBIRATO et al., 2015; TRANCOZO et al., artigo aceito para publicação), sugerem que a mutação c.1080+1G>T está presente em cerca de 3% dos casos de OI do Brasil. Esta hipótese se baseou em um número amostral de 30 pacientes não consanguíneos com diagnóstico clínico de OI. Além do presente estudo que analisou 10 pacientes, não há outros trabalhos científicos brasileiros que avaliaram mutações no gene *P3H1*. Assim, se contabilizarmos as amostras dos dois trabalhos que avaliaram esta mutação, é possível estimar a frequência da mutação c.1080+1G>T em menos do que 2,5% das amostras de pacientes brasileiros.

Contudo, são necessários mais estudos que analisem a frequência de mutações no gene *P3H1* em pacientes com OI para que o número amostral aumente e os dados de distribuição de mutações seja mais fidedigno para a população brasileira.

As doenças genéticas no Brasil são, por vezes, caracterizadas por apresentarem padrões de mutações e correlações genótipo/fenótipo distintas do restante do mundo (SALZANO, 2002). Considerando as ainda escassas publicações brasileiras sobre OI, o conhecimento sobre os dados clínico-epidemiológicos da doença ganha ainda mais importância. Assim, avaliar a distribuição da mutação c.1080+1G>T em pacientes brasileiros contribuirá para uma melhor abordagem do diagnóstico molecular, do aconselhamento genético, do tratamento e também das condições sociais que pesam sobre esta condição (LIMA; HOROVITZ, 2014).

Além disto, a caracterização de mutações é importante para o estabelecimento das associações entre o tipo de mutação e a sua manifestação clínica. A localização de uma mutação no gene pode estar relacionada à gravidade de uma doença, que ainda não está bem esclarecida, o que poderia facilitar a compreensão da grande heterogeneidade observada na referida anomalia. A importância de o paciente ter um diagnóstico molecular preciso está na possibilidade de identificar uma doença e buscar o tratamento mais adequado, vise a melhora da qualidade de vida, bem como, auxiliar no aconselhamento genético do paciente e seus familiares.

O acesso a um diagnóstico exato é de grande relevância em clínica médica porque, além da sua contribuição no planejamento familiar e aconselhamento genético, pode ter impacto no tratamento do paciente. Existem muitos casos onde pais saudáveis têm uma criança com OI e pode ser necessária investigação para descobrir se a criança tem uma mutação de novo ou uma forma recessiva da doença (STEINER; ADSIT; BASEL, 2013).

Responder a estes questionamentos e evitar um pré-natal invasivo e desnecessário traz a clínica uma resposta rápida, abrangente e precisa. Desenvolver técnicas para ajudar nas estratégias para a obtenção do diagnóstico molecular contribui para a condução deste tratamento. Uma vez que uma mutação causadora de OI não pode

ser identificada entre os genes estudados, é necessária a realização de uma análise nos outros genes associados a doença para ser definido um diagnóstico molecular dos pacientes.

O tratamento de doenças genéticas pode ser desafiador. Existem doenças genéticas que estão sendo tratadas e para isto é necessário o conhecimento sobre a mutação primária e o gene envolvido para pesquisas futuras planejarem novas estratégias de tratamento.

Como exemplo da importância de conhecimentos básicos de mutação primária no desenvolvimento biotecnológico podemos citar o caso da atrofia muscular espinhal (AME), doença causada por mutações no gene *SNM1*. A biotecnologia ofereceu novas bases para o tratamento molecular da AME. Nesta doença o gene mutado (*SMN1*), que atua no desenvolvimento do neurônio motor, sofre, normalmente, uma deleção, o que resulta na deficiência da proteína de sobrevivência do neurônio motor (SNM), culminando em morte celular progressiva e degeneração de funções motoras.

Embora seja uma doença rara (1/11.000 nascimentos) (SUGARMAN et al., 2012), é a mais comum de todas as doenças fatais de etiologia genética da infância (SWOBODA et al., 2005). O tratamento dos pacientes portadores da AME passa por avanços, ampliando a expectativa de vida destes pacientes (OSKOUI et al., 2007). A terapia gênica usando um vetor do vírus adeno-associado 9 (AAV9) é uma grande promessa para o tratamento de crianças que apresentam a AME tipo 1, a forma mais grave da doença (MENDELL et al., 2017; RAO; KAPP; SCHROTH, 2018).

A estratégia SMN funcionou porque pesquisadores que planejaram o tratamento molecular tinham conhecimento sobre os aspectos genéticos da mutação primária. O conhecimento prévio sobre os aspectos moleculares da AME, incluindo a caracterização da mutação primária nos pacientes, possibilitaram o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas de tratamento que tem contribuído com melhoras clínicas significativas na qualidade de vida e sobrevida dos pacientes (RAO; KAPP; SCHROTH, 2018).

Na OI ainda não há estratégias de terapias gênicas específicas, contudo, muitas são as promessas de desenvolvimento de tratamento utilizando como ferramenta o sistema CRISPR/Cas9, um novo sistema de edição do DNA. O aperfeiçoamento deste sistema tem como uma das finalidades editar o genoma de células-tronco *in vitro* mutadas para corrigir a mutação primária e introduzir as células-tronco corrigidas no organismo dos pacientes.

As ferramentas disponíveis e um constante aperfeiçoamento em biologia molecular podem suplementar o processo de diagnóstico da OI. A pesquisa acerca da OI continua e tem um grande potencial para traduzir uma nova compreensão do mecanismo em terapia clínica para indivíduos afetados. Novos genes descobertos e estudos acerca dos mesmos criam uma nova abordagem para categorizar os tipos desta doença através de seus mecanismos metabólicos conectados o que é extremamente eficaz para uma compreensão e simplificação do tratado atual desta anomalia.

7 CONCLUSÕES

A Osteogênese Imperfeita é uma doença de etiologia genética rara, de incidência aproximada de 1: 15.000, causada por mutações em genes que atuam, em geral, na síntese ou processamento do colágeno tipo I. Entre as formas de OI de herança autossômica recessiva, a mutação c.1080+1G>T do gene *P3H1* é, em geral, uma das mais comuns em vários países do mundo. No presente trabalho, esta mutação não foi identificada em nenhum dos 10 pacientes estudados. Esta informação somada aos dados de outros trabalhos brasileiros (BARBIRATO et al., 2015; TRANCOZO et al., artigo aceito para publicação) que avaliaram outros 30 pacientes com OI sugerem que a mutação c.1080+1G>T do gene *P3H1* é rara na população brasileira, perfazendo menos do que 2,5% dos casos.

A detecção da mutação, com posterior confirmação através das técnicas e métodos disponíveis em biotecnologia contribuem para o aumento das informações sobre a doença, incentivando a compreensão de seus aspectos clínicos e genéticos para o desenvolvimento de técnicas mais modernas para o diagnóstico molecular, contribuindo para um mais eficiente e fidedigno acompanhamento genético.

REFERÊNCIAS

- ALANAY, Y. et al. Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. **The American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 4, p. 551–559, 2010.
- AMARAL, A. **As origens dos negros do Brasil**. Disponível em: <<https://novaescola.org.br/conteudo/1319/as-origens-dosnegros-do-brasil>>.
- ARPONEN, H.; MÄKITIE, O.; WALTIMO-SIRÉN, J. Association between joint hypermobility, scoliosis, and cranial base anomalies in paediatric Osteogenesis imperfecta patients: a retrospective cross-sectional study. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 15, n. 1, p. 428, 2014.
- ÁRVAI, K. et al. Next-generation sequencing of common osteogenesis imperfecta-related genes in clinical practice. **Scientific reports**, v. 6, p. 28417, 2016.
- ASSAF, S.; KHAWAJA, M. Consanguinity trends and correlates in the Palestinian Territories. **Journal of Biosocial Science**, v. 41, n. 1, p. 107–124, 2009.
- BALDRIDGE, D. et al. CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive osteogenesis imperfecta. **Human mutation**, v. 29, n. 12, p. 1435–1442, 2008.
- BALJET, B. Aspects of the history of osteogenesis imperfecta (Vrolik's syndrome). **Anatomischer Anzeiger**, v. 184, n. 1, p. 1, 2002.
- BARDAI, G. et al. DNA sequence analysis in 598 individuals with a clinical diagnosis of osteogenesis imperfecta: diagnostic yield and mutation spectrum. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 12, p. 3607–3613, 2016.
- BARNES, A. M. et al. Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 26, p. 2757–2764, 2006.
- BARNES, A. M. et al. Lack of cyclophilin B in osteogenesis imperfecta with normal collagen folding. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 6, p. 521–528, 2010.
- BARSH, G. S.; BYERS, P. H. Reduced secretion of structurally abnormal type I procollagen in a form of osteogenesis imperfecta. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 8, p. 5142–5146, 1981.
- BIGGIN, A.; MUNNS, C. F. Osteogenesis imperfecta: diagnosis and treatment. **Current osteoporosis reports**, v. 12, n. 3, p. 279–288, 2014.
- BYERS, P. H. Osteogenesis imperfecta: perspectives and opportunities. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 12, n. 6, p. 603–609, 2000.
- BYERS, P. H.; PYOTT, S. M. Recessively inherited forms of osteogenesis imperfecta. **Annual review of genetics**, v. 46, p. 475–497, 2012.
- CABRAL, W. et al. **Founder mutation causing recessive type VIII osteogenesis imperfecta in West Africans and African-Americans is contemporaneous with Atlantic Slave Trade**. ASHG Meeting Honolulu, American Society Human Genetics. **Anais...**2009
- CABRAL, W. A. et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. **Nature genetics**, v. 39, n. 3, p. 359, 2007.
- CABRAL, W. A. et al. A founder mutation in LEPRE1 carried by 1.5% of West Africans and 0.4% of African Americans causes lethal recessive osteogenesis imperfecta. **Genetics in medicine**, v. 14, n. 5, p. 543, 2012.
- CAMPOS, A. P. Escravidão, reprodução endógena e criouliização: o caso do Espírito Santo no Oitocentos. **Topoi (Rio de Janeiro)**, v. 12, n. 23, p. 84–96, 2011.
- CHANG, W. et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 and CRTAP are mutually stabilizing in the

- endoplasmic reticulum collagen prolyl 3-hydroxylation complex. **Human molecular genetics**, v. 19, n. 2, p. 223–234, 2009.
- CHO, T.-J. et al. A single recurrent mutation in the 5'-UTR of IFITM5 causes osteogenesis imperfecta type V. **The American Journal of Human Genetics**, v. 91, n. 2, p. 343–348, 2012.
- CHRISTIANSEN, H. E. et al. Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. **The American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 3, p. 389–398, 2010.
- COLIGE, A. et al. cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: a new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 6, p. 2374–2379, 1997.
- DALGLEISH, R. The human type I collagen mutation database. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 1, p. 181–187, 1997.
- DALGLEISH, R. The human collagen mutation database 1998. **Nucleic acids research**, v. 26, n. 1, p. 253–255, 1998.
- DALGLEISH, R. **[osteogenesis imperfecta & Ehlers-Danlos syndrome variant databases]**. Disponível em: <<https://www.le.ac.uk/ge/collagen/>>.
- DE SOUZA, A. S. R. et al. Diagnóstico pré-natal e parto transpelviano na osteogênese imperfeita: relato de caso. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 28, n. 4, p. 244–250, 2006.
- FARRAR, M. A. et al. Emerging therapies and challenges in spinal muscular atrophy. **Annals of neurology**, v. 81, n. 3, p. 355–368, 2017.
- FINKEL, R. S. et al. Nusinersen versus sham control in infantile-onset spinal muscular atrophy. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 18, p. 1723–1732, 2017.
- FOLKESTAD, L. et al. Fracture Rates and Fracture Sites in Patients With Osteogenesis Imperfecta: A Nationwide Register-Based Cohort Study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 1, p. 125–134, 2017.
- FORLINO, A. et al. New perspectives on osteogenesis imperfecta. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 9, p. 540, 2011.
- FORLINO, A.; MARINI, J. C. Osteogenesis imperfecta. **The Lancet**, v. 387, n. 10028, p. 1657–1671, 2016.
- GAJKO-GALICKA, A. Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. **ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION**, v. 49, n. 2, p. 433–442, 2002.
- GARSTANG, J. **The Burial Customs of Ancient Egypt as illustrated by tombs of the Middle Kingdom**. [s.l.] A Constable & Company, Limited, 1907.
- GRAY, P. A case of osteogenesis imperfect, associated dentinogenesis imperfect, dating from antiquity. **Clinical Radiology**, v. 21, n. 1, p. 106–108, 1969.
- HARRINGTON, J.; SOCHETT, E.; HOWARD, A. Update on the Evaluation and Treatment of Osteogenesis Imperfecta. In: COOK, P. C. (Ed.). **Pediatric Clinics of North America**. 6. ed. [s.l.: s.n.]. p. 1243–1257.
- HUDSON, D. M. et al. Peptidyl 3-hydroxyproline binding properties of type I collagen suggest a function in fibril supramolecular assembly. **Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2417–2424, 2012.
- ISHIKAWA, Y. et al. Biochemical characterization of the prolyl 3-hydroxylase 1·cartilage-associated protein·cyclophilin B complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 26, p. 17641–17647, 2009.
- ISHIKAWA, Y.; BÄCHINGER, H. P. A molecular ensemble in the rER for procollagen

- maturation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 11, p. 2479–2491, 2013.
- KAISER-KUPFER, M. I. et al. Low ocular rigidity in patients with osteogenesis imperfecta. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 20, n. 6, p. 807–809, 1981.
- KANG, H.; MARINI, J. C. Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. **Translational Research**, v. 181, p. 27–48, 2017.
- KAUL, S. C. et al. Gros1, a potential growth suppressor on chromosome 1: its identity to basement membrane-associated proteoglycan, leprecan. **Oncogene**, v. 19, n. 32, p. 3576, 2000.
- KÖRKKÖ, J. et al. Analysis of the COL1A1 and COL1A2 genes by PCR amplification and scanning by conformation-sensitive gel electrophoresis identifies only COL1A1 mutations in 15 patients with osteogenesis imperfecta type I: identification of common sequences of null-allele. **The American journal of human genetics**, v. 62, n. 1, p. 98–110, 1998.
- LAMANNA, A. et al. Valvular and aortic diseases in osteogenesis imperfecta. **Heart, Lung and Circulation**, v. 22, n. 10, p. 801–810, 2013.
- LAND, C. et al. Effect of intravenous pamidronate therapy on functional abilities and level of ambulation in children with osteogenesis imperfecta. **The Journal of pediatrics**, v. 148, n. 4, p. 456–460, 2006.
- LIM, J. et al. Genetic causes and mechanisms of Osteogenesis Imperfecta. **Bone**, v. 102, p. 40–49, 2017.
- LIMA, M. A. DE F. D.; HOROVITZ, D. D. G. Contradições das políticas públicas voltadas para doenças raras: o exemplo do Programa de Tratamento da Osteogênese Imperfeita no SUS. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, p. 475–480, 2014.
- LINDAHL, K. et al. Treatment of osteogenesis imperfecta in adults. **European journal of endocrinology**, p. EJE-14, 2014.
- LOWENSTEIN, E. J. Osteogenesis imperfecta in a 3,000-year-old mummy. **Child's Nervous System**, v. 25, n. 5, p. 515–516, 2009.
- MAASALU, K. et al. Whole-exome sequencing identifies de novo mutation in the COL1A1 gene to underlie the severe osteogenesis imperfecta. **Human genomics**, v. 9, n. 1, p. 6, 2015.
- MANDER, L.; LIU, H.-W. **Comprehensive natural products II: Chemistry and Biology**. [s.l.] Elsevier, 2010. v. 1
- MARINI, J. C. et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. **Human mutation**, v. 28, n. 3, p. 209–221, 2007a.
- MARINI, J. C. et al. Components of the collagen prolyl 3-hydroxylation complex are crucial for normal bone development. **Cell cycle**, v. 6, n. 14, p. 1675–1681, 2007b.
- MARINI, J. C. A paper that provides the best genotype–phenotype correlation for collagen mutations. In: KLIEGMAN, R. et al. (Eds.). **Nelson Textbook of Pediatrics**. [s.l.: s.n.]. p. 2437–2440.
- MARINI, J. C. et al. Osteogenesis imperfecta. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17052, 18 ago. 2017.
- MARINI, J. C.; BLISSETT, A. R. New genes in bone development: what's new in osteogenesis imperfecta. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 8, p. 3095–3103, 2013.
- MARINI, J. C.; CABRAL, W. A.; BARNES, A. M. Null mutations in LEPRE1 and CRTAP cause severe recessive osteogenesis imperfecta. **Cell and tissue research**, v. 339,

n. 1, p. 59–70, jan. 2010.

MARINI, J. C.; REICH, A.; SMITH, S. M. Osteogenesis Imperfecta due to Mutations in Non-Collagenous Genes-Lessons in the Biology of Bone Formation. **Current opinion in pediatrics**, v. 26, n. 4, p. 500, 2014.

MCKIERNAN, F. E. Musculoskeletal manifestations of mild osteogenesis imperfecta in the adult. **Osteoporosis international**, v. 16, n. 12, p. 1698–1702, 2005.

MENDELL, J. R. et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 18, p. 1713–1722, 2017.

MOFFATT, P. et al. Bril: a novel bone-specific modulator of mineralization. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 9, p. 1497–1508, 2008.

MONTI, E. et al. Current and emerging treatments for the management of osteogenesis imperfecta. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 6, p. 367, 2010.

MOREIRA, C. L. M. et al. Independent walk in osteogenesis imperfect. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 19, n. 5, p. 312–315, 2011.

MORELLO, R. et al. CRTAP is required for prolyl 3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. **Cell**, v. 127, n. 2, p. 291–304, 2006.

MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. **TRENDS in Genetics**, v. 20, n. 1, p. 33–43, 2004.

NCBI. **P3H1 prolyl 3-hydroxylase 1 [Homo sapiens (human)]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64175#gene-expression>>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: [s.n.].

ORMEROD, E. L. **An Account of a Case of Mollities Ossium**. **British Medical Journal**, set. 1859.

OSKOU, M. et al. The changing natural history of spinal muscular atrophy type 1. **Neurology**, v. 69, n. 20, p. 1931–1936, 2007.

PALOMO, T. et al. Intravenous bisphosphonate therapy of young children with osteogenesis imperfecta: skeletal findings during follow up throughout the growing years. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 12, p. 2150–2157, 2015.

PEPIN, M. G.; BYERS, P. H. **What every clinical geneticist should know about testing for osteogenesis imperfecta in suspected child abuse cases**. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics. **Anais...Wiley Online Library**, 2015

PYOTT, S. M. et al. WNT1 mutations in families affected by moderately severe and progressive recessive osteogenesis imperfecta. **The American Journal of Human Genetics**, v. 92, n. 4, p. 590–597, 2013.

RAO, V. K.; KAPP, D.; SCHROTH, M. Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy: An Emerging Treatment Option for a Devastating Disease. **Journal of managed care & specialty pharmacy**, v. 24, n. 12–a Suppl, p. S3–S16, 2018.

REEDER, J.; ORWOLL, E. Adults with osteogenesis imperfecta. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 26, p. e28, 2006.

RIJKS, E. B. G. et al. Efficacy and safety of bisphosphonate therapy in children with osteogenesis imperfecta: a systematic review. **Hormone research in paediatrics**, v. 84, n. 1, p. 26–42, 2015.

ROBERTS, T. T. et al. Orthopaedic considerations for the adult with osteogenesis imperfecta. **JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 24, n. 5, p. 298–308, 2016.

ROBICHON, J.; GERMAIN, J. P. Pathogenesis of osteogenesis imperfecta. **Canadian**

Medical Association Journal, v. 99, n. 20, p. 975, 1968.

ROHRBACH, M.; GIUNTA, C. **Recessive osteogenesis imperfecta: clinical, radiological, and molecular findings**. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics. **Anais...**Wiley Online Library, 2012

SALZANO, F. M. Saúde pública no primeiro e terceiro mundos: desafios e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, p. 7–16, 2002.

SEMLER, O. et al. A mutation in the 5'-UTR of IFITM5 creates an in-frame start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus. **The American Journal of Human Genetics**, v. 91, n. 2, p. 349–357, 2012.

SHAKER, J. L. et al. Recent developments in osteogenesis imperfecta. **F1000Research**, v. 4, n. F1000 Faculty Rev, 2015.

SILLENCE, DO.; SENN, A.; DANKS, D. M. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. **Journal of medical genetics**, v. 16, n. 2, p. 101–116, 1979.

SIRDAH, M. M. Consanguinity profile in the Gaza Strip of Palestine: large-scale community-based study. **European journal of medical genetics**, v. 57, n. 2, p. 90–94, 2014.

STEINER, R.; ADSIT, J.; BASEL, D. COL1A1/2-Related Osteogenesis Imperfecta. In: **GeneReviews**. Seattle (WA): [s.n.].

SUGARMAN, E. A. et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of > 72 400 specimens. **European journal of human genetics**, v. 20, n. 1, p. 27, 2012.

SWOBODA, K. J. et al. Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number, and function. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 57, n. 5, p. 704–712, 2005.

TADMOURI, G. O. et al. Consanguinity and reproductive health among Arabs. **Reproductive health**, v. 6, n. 1, p. 17, 2009.

TRANCOZO, M. et al. Osteogenesis imperfecta in brazilian patients. **Genetics and molecular biology**, 2018.

TREJO, P.; RAUCH, F. Osteogenesis imperfecta in children and adolescents—new developments in diagnosis and treatment. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 12, p. 3427–3437, 2016.

TRYGGVASON, K. et al. Partial purification and characterization of chick-embryo prolyl 3-hydroxylase. **Biochemical Journal**, v. 183, n. 2, p. 303–307, 1979.

VALADARES, E. R. et al. What is new in genetics and osteogenesis imperfecta classification? **Jornal de pediatria**, v. 90, n. 6, p. 536–541, 2014.

VAN DIJK, F. S. et al. PPIB mutations cause severe osteogenesis imperfecta. **The American Journal of Human Genetics**, v. 85, n. 4, p. 521–527, 2009.

VAN DIJK, F. S. et al. EMQN best practice guidelines for the laboratory diagnosis of osteogenesis imperfecta. **European Journal of Human Genetics**, v. 20, n. 1, p. 11, 2012.

VAN DIJK, F. S.; SILLENCE, D. O. Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. **American journal of medical genetics Part A**, v. 164, n. 6, p. 1470–1481, 2014.

VRANKA, J. A.; SAKAI, L. Y.; BÄCHINGER, H. P. Prolyl 3-hydroxylase 1, enzyme characterization and identification of a novel family of enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23615–23621, 2004.

WARD, L. M. et al. Osteogenesis imperfecta type VII: an autosomal recessive form of brittle bone disease. **Bone**, v. 31, n. 1, p. 12–18, 2002.

WEIS, M. A. et al. Location of 3-hydroxyproline residues in collagen types I, II, III, and V/XI implies a role in fibril supramolecular assembly. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 4, p. 2580–2590, 2010.

WILLAERT, A. et al. Recessive osteogenesis imperfecta caused by LEPRE1 mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3-hydroxylation. **Journal of medical genetics**, v. 46, n. 4, p. 233–241, 2009.

WILLING, M. C. et al. Premature chain termination is a unifying mechanism for COL1A1 null alleles in osteogenesis imperfecta type I cell strains. **American journal of human genetics**, v. 59, n. 4, p. 799, 1996.